



HAL
open science

Rôle de la tyrosine kinase SYK dans la régulation du processus métastatique du mélanome

Emilien Garcia

► **To cite this version:**

Emilien Garcia. Rôle de la tyrosine kinase SYK dans la régulation du processus métastatique du mélanome. Biologie moléculaire. Université Côte d'Azur, 2016. Français. NNT : 2016AZUR4154 . tel-01984709

HAL Id: tel-01984709

<https://theses.hal.science/tel-01984709>

Submitted on 17 Jan 2019

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 Côte d'Azur

ECOLE DOCTORALE SCIENCE DE LA VIE ET DE LA SANTE (ED85)

Thèse

Présentée par **Emilien GARCIA** pour l'obtention du titre de :

Docteur en Science de la Vie et de la Santé

Spécialité : Interactions moléculaires et cellulaires

Rôle de la tyrosine kinase SYK dans la régulation du processus métastatique du mélanome

Soutenue publiquement le 15 décembre 2016 au Bâtiment Archimed, Nice, devant le jury
composé de :

Dr Stéphane ROCCHI

Président

Dr Peter COOPMAN

Rapporteur

Dr Paulo DE SEPULVEDA

Rapporteur

Dr Medhi KHALED

Examineur

Dr Marcel DECKERT

Co-directeur de thèse

Dr Sophie TARTARE-DECKERT

Co-directeur de thèse

Remerciements

Sophie, merci de m'avoir dans ton équipe, depuis le master 2 en 2011 jusqu'à la fin de ma thèse cette année en 2016 ! Merci pour ton aide et pour ta direction, avoir travailler dans l'équipe 11 restera un souvenir durable qui aura ancré en moi une méthodologie de travail certaine. Je te souhaite toute la réussite possible et plein de publications pour l'équipe !

Un grand merci Marcel pour l'encadrement au cours de ma thèse toutes ces années. J'ai apprécié travailler avec toi, merci pour ton engagement et ton implication qui m'auront permis d'aller jusqu'au bout dans cette étape importante de mon cycle d'étude. Je te souhaite à toi aussi beaucoup de réussite (et des matchs de tennis !).

Aude, merci de ton soutien ! La Veuve Noire laissera une marque durable sur mes souvenirs du labo ! Ne change pas, tu fais partie des gens qui font avancer les choses. Au plaisir de te recroiser sur une plage narbonnaise, on trinquera au muscat !

Mélanie, tu as été un modèle pour tous les thésards qui t'ont croisé. Merci beaucoup pour toute l'aide que tu m'aura apporté, niveau expérience et niveau humain. Bonne chance pour le reste de ta carrière scientifique, qui fera du bruit !

Nicholas, un grand merci pour toutes ces années. Se rencontrer au labo aura grandement coloré mes journées, travailler à côté de quelqu'un qui partageait autant de mes passions et intérêts était vraiment formidable ! Merci pour tous ces moments au labo et en dehors, et bonne chance pour la suite, tu seras un grand dentiste !

Anaïs, merci pour les rires et la bonne humeur ! Tu as choisis de consacrer ta vie aux enfants, les tiens et ceux des autres, je te souhaite de voir tous ces petits sourires toute ta vie.

Rania, tu sera la prochaine après moi à passer ta thèse, je te souhaite beaucoup de courage ! Merci pour les rires, les sucreries et les petits chats !

Ilona, attention au soleil ! Tu as de grandes qualités, de la volonté et de la bonne humeur. Je suis sur que tout se passera bien dans les prochaines années. Et sinon, une ballade à cheval et ça repart !

Moeez, bon chance pour tes prochaines recherches en Amérique, et fait attention à ne pas te trumper ! Merci pour toutes les discussions vidéo-ludiques et de pop-cultures qu'on a pu partager, tous mes vœux de bonheur avec ta petite famille.

Fred, l'expert FACS ! Ta maîtrise du sujet est toujours impressionnante, en rajoutant ta thèse à tout passif sur le sujet tu va devenir la référence régionale ! Bonne chance pour la suite.

Un grand merci à Virginie et à Christophe, les chercheurs du labo ! Vous êtes des modèles de travail et de persévérance pour tous les étudiants, je vous souhaite une grande carrière, avec plein d'articles dans Nature et Cell !

Christopher, Séréna, Robin, vous arrivez dans l'équipe au moment où je m'en vais, je ne peux donc que regretter de ne pas vous connaître autant que je le voudrais. Mais je vous souhaite toute la réussite possible dans vos thèses !

Une petite pensée aussi pour tous les masters qui sont passés dans l'équipe au cours des années : Mathilde, Fériel, Stéphanie, Yoann, Charlotte, Marie-Angela et Margaux. Vous avez tous pris des chemins variés, médecins, docteurs ou autre, bonne chance quelque soit votre voie !

Michel Ticchionni, merci pour le point de vue différent apporté sur les résultats et les problématiques, qui permettent un recul supérieur sur notre propre travail.

Alix, que de chemin parcouru en parallèle... On ne s'est pas quitté depuis ce fameux stage à l'IBV, mouches et bébés souris ! Batailles d'eau, poulet rôtis et tant d'autres souvenirs, qui ce sont amassés au cours de la licence, du master et toute la thèse... Je ne te remercierai jamais assez pour m'avoir autant soutenu et aidé dans les moments difficiles (je t'ai rendu la pareil, certes, mais merci tout de même). On commence tous les deux une nouvelle page de notre vie, et j'espère que l'on continuera à faire partie de notre histoire réciproque pour longtemps !

Nathan, merci mon grand Ouistillon™ ! Beaucoup de fous rires, de cafés répandus et de cocktails corsés ! On aura fait une super équipe pour embêter Alix au quotidien, sans toi pour prendre le relais j'aurais probablement du lui laisser des pauses ! Bonne chance pour la suite.

Un grand merci aux copains de l'équipe 6 ! Emilie, Daniel et Elsa, les deux premiers vous m'avez précédé dans la soutenance et je vous souhaite tout le bonheur du monde dans votre vie commune avec votre petit bout de chou. Quant à toi Elsa, ton moment de briller arrive bientôt, courage à toi pour ton grand show ! A cette fine équipe je rajoute aussi Christophe Reyman, tu n'as pas passé beaucoup de temps au labo mais cela aura été marquant, et tu ne te débarrassera pas de nous aussi facilement ! Bonne chance pour la fin de tes études.

Un grand merci aussi à tous les gérants de plateformes et de services, Damien Alcor, Jérôme Gilleron, Véronique Corcelle et son équipe ! Cela aura été un vrai plaisir de travailler avec vous, vous êtes géniaux !

Je remercie chaleureusement tous mes amis d'en dehors du labo, Lucie, Damien, Alexis, Océane, Brice, Ingrid, Laurent, Jérémy, Nicolas... et tous les autres de CPDR et d'ailleurs, vous m'avez permis de décompresser, de m'amuser, de pleurer, de rire, de m'évader en d'innombrables occasions. Chacun de vous m'est très précieux, merci encore de votre amitié, et on se revois très prochainement quand j'aurai plus de temps à consacrer à ma vie sociale !

Enfin, je remercie grandement mes parents, vous avez toujours cru en moi contre vents et marées, soutenus dans mes choix et m'avaient offert la possibilité d'aller jusqu'au bout dans les études que je souhaitais. Je ne vous remercierais jamais assez pour toutes les petites choses du quotidien que vous m'avez apportés, parfois invisibles mais indéniablement nécessaires. Et merci également d'avoir supporté mon caractère avec ses amples variations des dernières années. Et Papa, fait attention à ta santé s'il te plait ! Un grand merci également à ma sœur Aurélie, son mari Fabien et leur petite Eva, ma nièce préférée ! Bonne chance pour les prochains !

Sommaire

Sommaire	2
Liste des figures	7
Liste des abréviations	9
Introduction.....	13
I. Le mélanome cutané	13
A. Généralités	13
1. Epidémiologie	13
a. Un cancer de la peau léta l	13
b. Les facteurs de risques environnementaux	14
c. Les phototypes cutanés	15
d. Les prédispositions génétiques	16
2. Le point d'origine : le mélanocyte	16
a. Rôle physiologique du mélanocyte	16
b. Un partenaire fondamental : le kératinocyte	17
c. Les grains de beauté ou naevi	18
3. Les différents types de mélanomes	18
a. Le mélanome à extension superficielle (SSM)	18
b. Le mélanome nodulaire (NM)	18
c. Le mélanome lentigo malin (LMM) ou mélanome de Dubreuilh.....	19
d. Le mélanome acral-lentigineux (ALM)	19
e. Les mélanomes non-cutanés	19
B. La transformation : la Mélanomagenèse	20
1. L'initiation	20
2. La Phase Radiale de Croissance (RGP)	24
3. La Phase Verticale de Croissance (VGP).....	24
4. La Phase métastatique	25
C. Le microenvironnement tumoral	26
1. De nombreux acteurs	26
2. Les Fibroblastes, coordinateurs du microenvironnement	27
3. Les Fibroblastes associés aux Cancers (CAFS)	27
D. Le traitement du mélanome.....	28

1.	La prévention	28
2.	Le diagnostic : importance de la surveillance	29
3.	L'exérèse chirurgicale : le meilleur traitement mais aussi le plus limité	30
4.	Les thérapies contre les mélanomes métastatiques	31
a.	Les thérapies classiques.....	31
b.	L'immunothérapie	31
c.	Les thérapies ciblées.....	32
5.	La résistance thérapeutique	34
a.	La résistance intrinsèque	34
b.	La résistance acquise	35
II.	La transition épithélio-mésenchymateuse (EMT).....	37
A.	L'EMT dans le développement embryonnaire et les pathologies.....	37
B.	Les grandes étapes de l'EMT	37
1.	Déconstruction des jonctions cellulaires et de la polarité	38
2.	La modification du cytosquelette et la motilité	39
C.	Les changements d'expressions génétiques.....	40
1.	La transition des cadhérines.....	40
2.	Remodelage du cytosquelette	41
3.	Evolution du rapport à la matrice extracellulaire.....	41
D.	Les voies de contrôles de l'EMT	43
1.	Les facteurs de transcriptions contrôlant l'EMT.....	43
a.	Les facteurs de transcription SNAIL et SLUG.....	44
b.	Les facteurs de transcription bHLH	46
c.	Les facteurs de transcription ZEB	47
d.	Les nouveaux facteurs de transcription régulant l'EMT	47
2.	La famille TGF β , inductrice de l'EMT	48
3.	Les Récepteurs Tyrosines Kinases (RTKs) induisant l'EMT	49
a.	Activations des voies PI3K/AKT et ERK/MAPK par les facteurs de croissance	49
b.	Le FGF dans l'EMT	50
c.	Le HGF dans l'EMT.....	50
d.	L'IGF1 dans l'EMT	50
e.	L'EGF dans l'EMT	51
f.	Le PDGF dans l'EMT	51
4.	Les autres signaux extracellulaires qui régulent l'EMT	52

E.	L'EMT et la résistance thérapeutique des cancers	54
1.	L'efflux cellulaire et les transporteurs ABC.....	54
2.	La résistance à l'apoptose	54
3.	Le rôle du microenvironnement.....	55
F.	Mélanome et transition de phénotype de type EMT	55
1.	Les inducteurs de la transition de phénotype du mélanome	56
2.	Les voies de signalisation impliquées dans la transition de phénotype du mélanome	58
3.	Implications de la transition de phénotype dans la réponse aux thérapies.....	59
III.	SYK : Spleen tYrosine Kinase	61
A.	Les Protéines Tyrosine Kinases (PTKs)	61
B.	Généralités sur SYK.....	61
1.	Structure	61
2.	Activation de SYK via ses phosphorylations	62
3.	Epissage alternatif : la forme SYK-B	64
4.	ZAP70	64
5.	Conservation au cours de l'évolution et développement embryonnaire.....	65
C.	Rôle physiologique	65
1.	Les voies de signalisation dépendantes de SYK.....	65
a.	BLNK	66
b.	La voie des enzymes lipidiques : PI3K et PLC γ	67
c.	La voie des MAP kinases.....	68
d.	La voie NF- κ B.....	68
e.	La voie Rho	68
f.	Signalisation non dépendante de l'activité kinase de SYK	69
2.	Rôle dans les cellules hématopoïétiques.....	69
a.	Signalisation des récepteurs à motif ITAM	69
b.	Signalisation des récepteurs sans motifs ITAM	70
c.	Signalisation activée par le stress oxydatif	71
3.	Rôle dans les cellules non hématopoïétiques	71
4.	Rôle dans la peau.....	73
D.	Les pathologies cancéreuses	73
1.	SYK, promoteur de tumeur.....	73
a.	La survie dans les cancers hématopoïétiques sous le BCR.....	75
b.	La survie dans les cancers hématopoïétiques via la voie PI3K/AKT	78

c.	La survie dans les cancers hématopoïétiques indépendants du BCR	79
d.	Les fusions de SYK.....	81
e.	Signalisation ITAM dans les cancers non hématopoïétiques	82
f.	La survie cellulaire dans les cancers non hématopoïétiques	83
2.	SYK, suppresseur de tumeur	84
a.	La suppression tumorale dans les LAL-B.....	85
b.	La suppression tumorale dans les carcinomes	85
c.	La suppression tumorale dans les mélanomes.....	89
IV.	La voie des Intégrines	91
A.	Généralités.....	91
1.	Structure	91
2.	L'activation des intégrines.....	91
3.	Le recyclage des intégrines.....	93
4.	Les différentes catégories d'intégrines	94
a.	Les récepteurs d'adhésion leucocytaires	94
b.	Les récepteurs au collagène	95
c.	Les récepteurs à la laminine	96
d.	Les récepteurs au motif RGD.....	97
B.	Les intégrines comme acteurs clefs des structures cellulaires d'adhésion.....	98
1.	Les fibres de stress et les adhésions focales.....	98
2.	Les invadosomes : podosomes et invadopodes	100
C.	La migration cellulaire	103
1.	Les modèles de migration cellulaire.....	103
a.	La migration individuelle	104
b.	La migration collective.....	104
c.	Plasticité de la migration	105
2.	Guider la migration, une histoire de -taxie.....	105
a.	L'haptotaxie et l'haptoréulsion	106
b.	L'haptokinésie	106
c.	La chimiotaxie	107
d.	La durotaxie	108
e.	Les flux et les contraintes de cisaillement	108
f.	L'électrotaxie.....	109
D.	Intégrines et Cancers	109

1.	Rôle des intégrines dans les cellules souches	111
2.	Les intégrines et l'initiation tumorale	113
a.	La régulation des intégrines dans les cellules initiatrices de tumeurs.....	113
b.	La voie non-canonique indépendante des ligands	114
3.	Rôle des intégrines dans la propagation métastatique.....	115
a.	L'invasion locale	115
b.	Survie en suspension dans le flot sanguin	116
c.	Colonisation de la niche métastatique	117
d.	Rôles dans la néo-angiogenèse	119
4.	Intégrines et résistance thérapeutique.....	119
a.	Rôle des intégrines dans la résistance thérapeutique.....	119
b.	Le ciblage thérapeutique des intégrines	120
V.	Résultats.....	122
A.	Contexte et Objectifs de recherche.....	122
B.	Abstract.....	124
C.	Description des résultats	125
VI.	Discussion et perspectives.....	135
1.	L'extinction de SYK favorise un phénotype agressif dans les cellules de mélanome.....	136
2.	La délétion de <i>Syk</i> dans les mélanocytes de souris augmente l'invasion tumorale induite par l'oncogène BRAF ^{V600E} et la perte du suppresseur de tumeur PTEN	139
3.	Conclusion.....	142
VII.	Références.....	143

Liste des figures

Figure 1 : Les principaux cancers cutanés	14
Figure 2 : Les différents phototypes cutanés	15
Figure 3 : La peau	16
Figure 4 : Les différents types de mélanomes.....	18
Figure 5 : Du mélanocyte au mélanome métastatique	20
Figure 6 : Les altérations génétiques du mélanome	20
Figure 7 : Activation des ERK en présence de BRAF ^{V600E} , NRAS ^{mut} et RAC1 ^{P29S}	22
Figure 8 : La voie PI3K-AKT	23
Figure 9 : La voie de p53.....	24
Figure 10 : La dissémination métastatique	25
Figure 11 : Le stroma	26
Figure 12 : Fibroblaste normal versus Fibroblaste activé	28
Figure 13 : La règle ABCDE	29
Figure 14 : La classification TNM	30
Figure 15 : Mécanisme d'action des immunothérapies anti CTLA4 et PD1/PDL-1	31
Figure 16 : Traitement d'un mélanome aux inhibiteurs de BRAF et rechute.....	33
Figure 17 : Les événements cellulaires au cours de l'EMT	38
Figure 18 : Les facteurs de transcriptions de l'EMT	43
Figure 19 : Rôles et régulations des facteurs de transcriptions majeurs de l'EMT	44
Figure 20 : Les voies de signalisation impliquées dans l'EMT	52
Figure 21 : Les inducteurs de la transition phénotypique du mélanome	57
Figure 22 : Les PTKs Humaines	61
Figure 23 : Structure de SYK	62
Figure 24 : Structure comparative de SYK avec les autres membres de sa sous-famille	64
Figure 25 : Les partenaires de SYK.....	66
Figure 26 : Signalisation de SYK dans le BCR	66
Figure 27 : Cancers dans lesquels SYK est promoteur de tumeur.....	74
Figure 28 : SYK et la voie PI3K/AKT.....	78
Figure 29 : Cancers dans lesquels SYK est suppresseur de tumeur	84
Figure 30 : Mécanisme de sénescence dans le mélanome	90
Figure 31 : Le réseau mécanique cellulaire	91
Figure 32 : La structure des intégrines	91
Figure 33 : Mécanismes d'activation des intégrines	91
Figure 34 : Le recyclage des intégrines.....	93
Figure 35 : Les sous-types d'intégrines selon leurs affinités	94
Figure 36 : Les fibres de stress	98
Figure 37 : Les adhésions focales	99
Figure 38 : Structure des invadosomes	101
Figure 39 : Maturation et activation des invadosomes.....	102
Figure 40 : La migration, individuelle ou collective	104
Figure 41 : Les différents types de migration.....	105
Figure 42 : Les intégrines impliquées dans le cancer	109
Figure 43 : Spécificités de ligand des couples d'intégrines	110

Figure 44 : Signalisation canonique et non-canonique des intégrines.....	114
Figure 45 : SYK expression in melanocytes versus melanomas	122
Figure 46 : SYK extinction increases cell adhesion on extracellular matrix components	125
Figure 47 : SYK extinction promotes cell spreading on fibronectin	125
Figure 48 : SYK extinction increases cell motility on extracellular matrix components.....	126
Figure 49 : SYK extinction enhances melanoma haptotactic/chimiotactic migration, collagen invasion and experimental metastasis <i>in vivo</i>	126
Figure 50 : SYK ectopic expression inhibits melanoma chimiotactic migration, collagen invasion and experimental metastasis <i>in vivo</i>	128
Figure 51 : SYK depletion increases β 1 integrin expression, focal adhesion signaling and mesenchymal-like phenotype	128
Figure 52 : SYK extinction increases the number and stability of focal adhesions	129
Figure 53 : Co-localization of SYK and β 1 integrin.....	130
Figure 54 : Relevance of the mouse model in studying Syk function in melanocyte development and melanomagenesis.....	131
Figure 55 : Construction of a Syk conditional knockout allele	131
Figure 56 : <i>Tyr::Cre;Sykflox/flox</i> mouse model of <i>Syk</i> invalidation in the melanocytic lineage	132
Figure 57 : Implication of <i>Syk</i> in melanoma development in mice : macroscopic observation.....	133
Figure 58 : Implication of <i>Syk</i> in melanoma development in mice : histological analysis	134

Liste des abréviations

3BP2 : c-Abl Src homology 3 domain-binding protein-2	c-MYC : v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog
ABC : ATP-binding cassette	CRB : Crumbs
AchR : Acetylcholine Receptor	CS-1 : Cleavage Signal-1 Protein
ADAM : a disintegrin and metalloproteinase	CSC : Cancer Stem Cell.
AKT/PKB : Protein Kinase B	CTBP : Carboxyl terminal binding protein
ALK2 : activin receptor-like kinase-2	Carboxyl terminal binding protein
ALM : Acral lentiginous melanoma	CTLA-4 : Cytotoxic T-lymphocyte Associated protein 4
ARP2/3 : Acidic Ribosomal Protein 2/3	CXCR4/7 : CXC chemokine receptor 4
AVC : Accident Vasculaire Cérébral	
	DAG : 1,2-diacylglycérol
BAFF : B-cell activating factor	DAP12 : DNAX activation protein of 12kDa
BASH : B cell adaptor containing SH2 domain)	DCIS : Ductal carcinoma in situ
BCAP : B-Cell activator for PI3K	DIA1 : diaphorase-1
BCL-2/6 : B-cell lymphoma 2/6 protein	DLBCL : Diffuse large B-cell lymphoma
BCL-XL : B-cell lymphoma extra large protein	
BCR : B-cell receptor	EBV : Epstein-Barr virus
bFGF : Basic fibroblast growth factor	EGCG : Epigallocatechin gallate
bHLH : basic helix-loop-helix	EGF : Epidermal Growth Factor
BLNK : B-cell linker	EGFR: Epidermal Growth Factor Receptor
BMI-1 : B lymphoma Mo-MLV insertion region 1 homolog	EGR1 : Early growth response protein 1
BRG1 : Brahma-related gene-1	EMDR : Environment Mediated Drug Resistance
BTK : Bruton's tyrosine kinase	EMT : Epithelial-Mesenchymal Transition
	ERK 1-2: Extracellular signal–Regulated Kinases 1 or 2
Cadhérine E/N /VE: Cadhérine Epithéliale, Neuraleou Endothéliale Vasculaire	ERM : Ezrine, Radixine et Méosine
CAFs : Cancer-Associated Fibroblasts	ETS1 : Avian erythroblastosis virus E26 homolog-1
CAM : Cell adhesion molecule	EZH2 : Enhancer of zeste homolog 2
CAM-DR : Cell Adhesion Mediated Drug Resistance	
Cbl : Casitas B-lineage Lymphoma	FAK : Focal Adhesion Kinase
Cdc42 : Cell division cycle 42	FcR : Fragment, crystallizable, receptor
CDK : cyclin-dependent kinase	FGF : Fibroblast Growth Factor
CDK4 : Cyclin-dependent kinase 4	FGFR : Fibroblast Growth Factor Receptor
c-Fms : Colony-stimulating factor-1 receptor	FLT3 : Fms-like tyrosine kinase 3
	FOX : Forkhead box
	FRA1 : Fos-related antigen 1
	FYN : Fgr/Yes related novel protein

FZD : Frizzled
 FZD6 : Frizzled class receptor 6

 GAP : GTPase activating protein
 GDI : guanosine nucleotide dissociation inhibitor
 GEF : Guanine nucleotide exchange factors
 GLI : Glioma zinc-finger protein
 GRB2 : Growth factor Receptor-Bound protein 2
 GSK3 : Glycogen synthase kinase 3

 HCC : Hepatocellular Carcinoma
 HEL : Hen Egg Lysozyme
 HER2 : human epidermal growth factor 2
 HGF : hepatocyte growth factor
 HH : Hedgehog
 HIF1 α : Hypoxia-inducible factor 1-alpha
 HS1 : Haematopoietic lineage cell-specific protein 1
 HTK : Hydra vulgaris protein-tyrosine kinase

 IARC : The International Agency for Research on Cancer
 ICAM : Intercellular Adhesion Molecule 1
 ID : inhibitor of DNA binding
 IDC : Invasive ductal carcinoma
 IGF1 : insulin-like growth factor-1
 ILK : Integrin-linked kinase
 INCa : Institut National du Cancer
 IP3 : 1,4,5-triphosphate
 ITAM : immunoreceptor tyrosine-based activation motif
 ITIM : immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif
 ITK : interleukin-2-inducible T-cell kinase

 JAK1 : Janus kinase 1
 JNK : c-Jun NH2-terminal protein kinase

 KIT : proto-oncogene receptor tyrosine kinase

 L1-CAM : L1 cell adhesion molecule

 LAD-1 : Ladinin-1
 LAM : leucémie aiguë myéloblastique
 LAT : L-type amino acid transporters
 LATS2 : Large Tumor Suppressor 2
 LCM : Leucémie myéloïde chronique
 LDGCB : Lymphome diffus à grandes cellules B
 LEF1 : lymphoid enhancer binding factor 1
 LF : Lymphome folliculaire
 LFA-1 : Lymphocyte function-associated antigen 1
 LIMK : LIM kinase
 LLA-B : Leucémie lymphoblastique aigüe B
 LLC-B : Leucémie lymphoblastique chronique B
 LMM : Lentigo maligna melanoma
 LMP2A : Latent membrane protein 2A
 LOX : Lysyl Oxidase
 LOXL2 : Lysyl Oxidase Like 2
 LPS : lipopolysaccharide
 LSD1 : Lysine-specific demethylase 1
 LZM : Lymphomes de la zone marginale

 MAdCAM-1 : mucosal vascular addressin cell adhesion molecule 1
 MAP1B : microtubule associated protein 1B
 MAPK : Mitogen-activated protein kinases
 MC1R : melanocortin receptor 1
 MCL-1 : Induced myeloid leukemia cell differentiation protein
 M-CSF : Macrophage Colony-Stimulating Factor
 MDM2-4 : Mouse double minute 2 or 4
 MEC : Matrice Extra Cellulaire
 MED12 : Mediator complex subunit 12
 MEK : MAPK/ERK Kinase
 MET : Mesenchymal-Epithelial Transition
 MITF : Microphthalmia-associated transcription factor
 MLC2 : Myosin Light Chain 2
 MMP : Matrix metalloproteinases/proteinases
 mTOR : Mammalian target of rapamycin
 MTX : Methotrexate

Nck : non-catalytic region of tyrosine kinase adaptor protein

NCL : nucléoline

NHE3 : sodium–hydrogen exchanger 3

NK : Natural killer

NM : Nodular melanoma

NSCLC : non-small cell lung cancer

OIS : Oncogene-induced senescence

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

PAK1 : p21 activated kinase 1

PALS1 : Protein Associated with LIN7-1

PAR : Protease-activated receptor

PATJ : PALS1-associated TJ protein

PCAF : P300/CBP-associated factor

PD-1/PDCD1 : Program cell Death 1 (CD27a)

PDAC : Pancreatic ductal adenocarcinoma

PDGF : Platelet derived growth factor

PDGFr : Platelet derived growth factor receptor

PDK1-2 : Pyruvate dehydrogenase lipoamide kinase isozyme 1 or 2

PD-L1 : PD1 ligand (CD274)

PI3K : phosphoinositide 3-kinase

PINCH : cysteine-histidine-rich protein

PIP2-3 : phosphatidylinositol-4,5-bis(/tri)phosphate

PKC : Protein Kinase C

PKD : protéine kinase D

PLC : Phosphoinositide phospholipase C

PLD : Phospholipase D

PRC : Protein Regulator of cytokinesis

PSGL-1 : P-selectin glycoprotein ligand-1

PTC : Peripheral T-Cell

PTCL : Peripheral T-Cell Lymphoma

PTEN : Phosphatase and TENsin homolog

PTK : Protéine tyrosine kinase

PTLD : Posttransplant lymphoproliferative disease

PTPROt : Protein tyrosine phosphatase receptor-type O truncated

Rac1 : Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1

RAF : Rapidly Accelerated Fibrosarcoma

RANTES : Regulated on Activation, Normal T cell Expressed and Secreted

RAS : Rat sarcoma

RB : retinoblastoma protein

RCP : Reactive C protein

RGP : Radial Growth Phase

Rho : Ras homolog

ROCK : Rho-associated protein kinase

ROR1/2 : RAR-related orphan receptor 1/2

RPS6KA1 : Ribosomal protein S6 kinase alpha-1

RTK : Receptor tyrosine kinase

SCCHN : squamous cell carcinomas of the head and neck

SCF : Stem Cell Factor

SCLC : small cell lung cancer

SCP1 : Human Synaptonemal Complex Protein 1

Ser UPAR : seprase and urokinase plasminogen activator surface receptor

SFM-DR : Soluble Factor Mediated Drug Resistance

SHARK (SH2 domain ankyrin repeat kinase 4)

Shc : Src homology 2 domain containing

SHH : Sonic Hedghog

SHIP1 : Src homology 2 domain–containing inositol-5-phosphatase 1

SHP-1 : Src homology 2 domain tyrosine phosphatases

SIN3A : SIN3 Transcription Regulator Family Member A

SLP : Synaptotagmin-Like Protein

SMAD : Small Mothers against Decapentaplegic

SOS : Son of Sevenless

SOX : SRY box

Sp1 : specificity protein 1

SPARC : secreted protein, acidic, cysteine-rich

SSM : Superficial spreading melanomas

STAT : signal transducer and activator of transcription

STAT3 : Signal transducer and activator of transcription 3

SUV39H1 : suppressor of variegation 3-9 homolog 1

SWI/SNF

SYK : Spleen tyrosine Kinase

TBK1 : Tank-binding kinase 1

TBX2 : T-box transcription factor 2

TCF : Transcription factor

TCR : T-cell receptor

TGF- β : Transforming Growth Factor 1

TKs : Tyrosine kinase

TNF : Tumor Necrosis Factor

TNFR : Tumor Necrosis Factor Receptor

TRP1-2 : Tyrosinase-related protein 1 or 2

TWIST1/2 : Twist-related protein 1 or 2

UV A/B/C : rayonnement Ultra-Violet A, B ou C

VASP : Vasodilator-stimulated phosphoprotein

V-CAM : Vascular cell adhesion protein

VEGF : Vascular endothelial growth factor

VEGFR : Vascular endothelial growth factor Receptor

VG1 : Vegetalising factor 1

VGP : Vertical Growth Phase

VLA-4 : Very Late Antigen-4

Wnt : Wingless type

YAP : Yes Associated Protein

ZAP-70 : Zeta-chain-associated protein kinase 70

ZEB : Zinc finger E-box-binding homeobox

ZO-1 : Zonula occludens-1

α MSH : α -Melanocyte-Stimulating Hormone

α SMA : Smooth muscle actin

INTRODUCTION

Introduction

I. Le mélanome cutané

A. Généralités

1. Epidémiologie

a. Un cancer de la peau léta

Les cancers font partie des maladies de notre époque les plus mortelles dans le monde. L'OMS recensait en 2012 approximativement 14 millions de nouveaux cas de cancers par an, prédisant que ce nombre s'élèverait à 22 millions dans les 20 ans suivants. Sur la même période, les décès dus aux cancers sont passés de 8,2 millions par an en 2012 à 13 millions par an.

Les cancers les plus communément diagnostiqués sont ceux du poumon (1,8 million, soit 13% du total), du sein (1,7 million, 11,9%) et du gros intestin (1,4 million, 9,7%). Les cancers les plus létaux sont ceux du poumon (1,6 million, soit 19,4% du total), du foie (0,8 million, 9,1%) et de l'estomac (0,7 million, 8,8%) (World Cancer Report 2014, IARC).

Parallèlement à ces données, les cancers cutanés, bien que nombreux avec 2 à 3 millions de nouveaux cas chaque année, sont relativement peu mortels (à l'exception notable du mélanome). Cependant, l'incidence des cancers de la peau est en constante augmentation depuis les dernières décennies, l'OMS rapportant qu'un cancer diagnostiqué sur trois est un cancer de la peau. Ces cancers peuvent être classés en deux grandes catégories, les carcinomes et les mélanomes, et sont directement reliés à l'exposition au rayonnement UV solaire (UVA et UVB).

Les plus fréquents des cancers cutanés sont les carcinomes, essentiellement originaires des kératinocytes et comprenant les sous-catégories des carcinomes basocellulaires et épidermoïdes, ces derniers étant presque aussi dangereux que les mélanomes. Ils représentent 95% de l'ensemble des cancers cutanés, sont rarement létaux mais le retrait chirurgical est douloureux et souvent défigurant. L'évolution de l'incidence de ces cancers est difficilement quantifiable au vu de leur faible malignité, mais il a pu être établi que les carcinomes sont plus fréquents sur les parties du corps communément exposées au soleil, comme les oreilles, le visage, le cou et les avant-bras. Ceci implique qu'une exposition sur le long terme et répétée aux UV est la cause majeure de leur développement.

Le mélanome est quant à lui le cancer cutané le plus létal, du fait de son fort potentiel métastatique. Sa prévalence est faible parmi les cancers de la peau, il ne représente qu'environ 5% de cette catégorie mais est responsable de plus de 80% des décès dus aux cancers cutanés. Le mélanome se développe en tumeur maligne à partir des mélanocytes, cellules pigmentées localisées dans l'épiderme (mélanome cutané), dans l'iris ou au niveau de certaines muqueuses.

Ainsi, si le mélanome cutané est détecté dans les premières étapes de son développement il peut être retiré par simple exérèse chirurgicale, mais si le cancer a commencé à métastaser son traitement devient bien plus problématique, faisant considérablement baisser le taux de survie.

Les dernières données de l'OMS, ainsi que le dernier rapport de l'INCa (Institut National du Cancer) de 2012 font état de la situation mondiale et française regardant le mélanome : 132 000 nouveaux cas par an de mélanomes cutanés ont été diagnostiqués dans le monde, dont 11 176 en France, ce qui le place au 9^{ème} rang des cancers tous sexes et âges confondus, et au 15^{ème} rang à l'égard des décès.

Ce cancer a cependant un âge de survenue tardif avec 70 à 80% des nouveaux cas diagnostiqués après 49 ans. L'âge médian de diagnostic calculé en 2012 est estimé à 64 ans chez les hommes et 61 ans chez les femmes. Le mélanome survient également chez des personnes plus jeunes, il est le cancer numéro 1 chez les femmes de 20 à 29 ans avant même le cancer du sein.

Figure 1 : Les principaux cancers cutanés

b. Les facteurs de risques environnementaux

De nombreux facteurs environnementaux sont connus pour être impliqués dans la survenue des cancers, tels l'alimentation, l'exposition à la pollution, aux pesticides, aux perturbateurs endocriniens... la liste est longue, mais le facteur externe majoritairement impliqué dans la survenue des carcinomes et mélanomes reste l'exposition aux UV solaires : à l'exception des mélanomes des paumes et des plantes de pieds (moins de 5% des mélanomes cutanés), le mélanome est épidémiologiquement lié aux radiations UV (Garibyan and Fisher, 2010).

D'après l'OMS, des expositions fortes et répétées pendant l'enfance et l'adolescence aux UV solaires augmentent fortement le risque de développer un mélanome. Ce risque peut directement être corrélé à la latitude et à la durée moyenne d'ensoleillement de la zone géographique, avec l'incidence record d'apparition de mélanomes dans la population blanche d'Australie, où 10 à 20 fois plus de mélanomes sont diagnostiqués que dans les populations blanches européennes.



Carcinome basocellulaire



Carcinome épidermoïde



Mélanome malin

Figure 1 : Les principaux cancers cutanés

Issue du site officiel de l'OMS

On peut noter que l'importance de ces risques environnementaux est essentiellement dépendante du comportement des populations, toujours d'après l'OMS. Ainsi, la prévention vis-à-vis de l'exposition solaire permet d'atténuer coups de soleil, photo-vieillessement des tissus et, directement, le développement de cancers cutanés.

c. Les phototypes cutanés

Si l'exposition aux UVs est le premier facteur à risque de développement du mélanome, c'est au niveau des défenses naturelles de l'organisme contre ces radiations que se situent les enjeux. La peau se protège des radiations UVs grâce à l'action des mélanocytes qui synthétisent les pigments de la mélanine et les distribuent à travers l'épiderme, c'est le bronzage. Cette capacité à produire et à distribuer la mélanine conditionne la vulnérabilité aux UVs, et de fait les risques de développement d'un mélanome (Bliss et al., 1995).

Cette défense innée est héréditaire et dépend de caractéristiques physiques précises, telle la couleur de la peau, des cheveux ou encore les capacités de bronzage : l'intégration de l'ensemble de ces critères définit le phototype (Fitzpatrick, 1988), repris dans la figure 2. Ainsi, les personnes de phototypes I et II, caractérisées par une peau très claire et des cheveux blonds ou roux, sont particulièrement sensibles aux mélanomes cutanés. A l'inverse, les individus à la peau mate et cheveux bruns des phototypes III et IV disposent d'une protection naturelle au soleil et ont moins de risques de développer un mélanome, tandis que les personnes de phototype V et VI, à la carnation sombre, n'en développent que très rarement.

Figure 2 : Les différents phototypes cutanés

Un autre critère de risque est la présence de "grains de beauté" ou naevi : en effet, si 75% des mélanomes cutanés surviennent *de novo* (à partir d'une zone saine de la peau), dans 25% des cas ceux-ci se développent à partir d'un naevus préexistant (Elder, 2006). Ainsi l'on considère une personne à risque à partir d'un nombre élevé de naevi sur l'ensemble du corps (plus de 100) et/ou la présence de naevi atypiques (Elwood et al., 1990; Tucker et al., 1997).

Un naevus commun, bénin, est une hyper-prolifération mélanocytaire épidermique et/ou dermique formant une "lésion pigmentée". Ces "grains de beauté" apparaissent majoritairement pendant les 30 premières années de vie et présentent peu de risques de transformation maligne. On peut également classer dans cette catégorie les grands naevi congénitaux présents dès la naissance ou apparaissant précocement, et pouvant s'étaler sur plusieurs centimètres. Ces naevi ont un risque élevé de transformation maligne, mais leur exceptionnelle rareté fait que leur incidence globale est très faible.

Phototypes	Couleur de peau	Couleur des cheveux	Tache de rousseurs	Vulnérabilité aux coups de soleils	Capacité de bronzage
Phototype I	Très blanche	Roux ou blonds	Très nombreuses	Extrême	Nulle
Phototype II	Claire	Blonds à châains clair	Fréquentes	Constante	Hâle léger
Phototype III	Claire	Châains à bruns	Rares	Fréquente	Hâle moyen
Phototype IV	Mate	Bruns à noirs	Aucune	Rare	Bronzage foncé
Phototype V	Marron	Noirs	Aucune	Exceptionnelle	Bronzage très foncé
Phototype VI	Noire	Noirs	Aucune	Jamais	Bronzage noir

Figure 2 : Les différents phototypes cutanés

Adaptée de (Fitzpatrick, 1988)

Les naevi atypiques présentent quant à eux une taille supérieure à 5 mm, ils sont plans (maculeux) et présentent deux des critères suivants : asymétrie, bords irréguliers, polychromie. Pour les identifier, la règle ABCDE peut-être appliquée afin d'un auto-dépistage rapide (voir figure 12 en Partie I.B). Si de nombreux naevi atypiques sont présents chez un individu on parlera alors de syndrome des naevi atypiques. Ces naevi ont tendance à se développer tout au long de la vie, l'exposition aux UVs les rendant d'autant plus instables et augmentant les risques de développement de mélanomes cutanés.

d. Les prédispositions génétiques

Outre la vulnérabilité intrinsèque des différents phototypes, différents terrains génétiques héréditaires peuvent influencer sur les risques de développement d'un mélanome. Ainsi, environ 10% des mélanomes surviennent dans un contexte de mélanome familial (Greene et al., 1985; Lynch et al., 1995), catégorisé par l'existence d'au moins un cas chez un parent du premier degré ou d'au moins deux cas sur trois générations. En moyenne, ces mélanomes se développent plus précocement avec un risque de mélanome multiple.

2. Le point d'origine : le mélanocyte

a. Rôle physiologique du mélanocyte

Les mélanocytes sont des cellules pigmentées originaires de la crête neurale et présentes dans de nombreux organes, tels la choroïde de l'œil (iris), les valves du cœur, la cochlée de l'oreille interne et les leptoméniges du cerveau (la pie-mère). Mais ils sont essentiellement connus pour être des cellules résidentes de la peau et responsables de sa photo-protection. Ils sont situés au niveau de la lame basale entre le derme et l'épiderme. Leur morphologie est de type dendritique, avec de nombreuses extensions en étoile qui se répandent à travers l'épiderme et distribuent les pigments synthétisés.

Figure 3 : La peau

Avec environ 1000 à 2000 mélanocytes par mm² de peau, la pigmentation résulte d'un mélange de deux sortes de pigments mélanines : les eumélanines et les phéomélanines. Ils sont issus de la mélanomagenèse, un processus enzymatique produisant ces deux biopolymères de tyrosine. Ils sont ainsi synthétisés à partir de la tyrosine, un précurseur commun aux deux voies, oxydée en dopaquinone par l'enzyme tyrosinase.

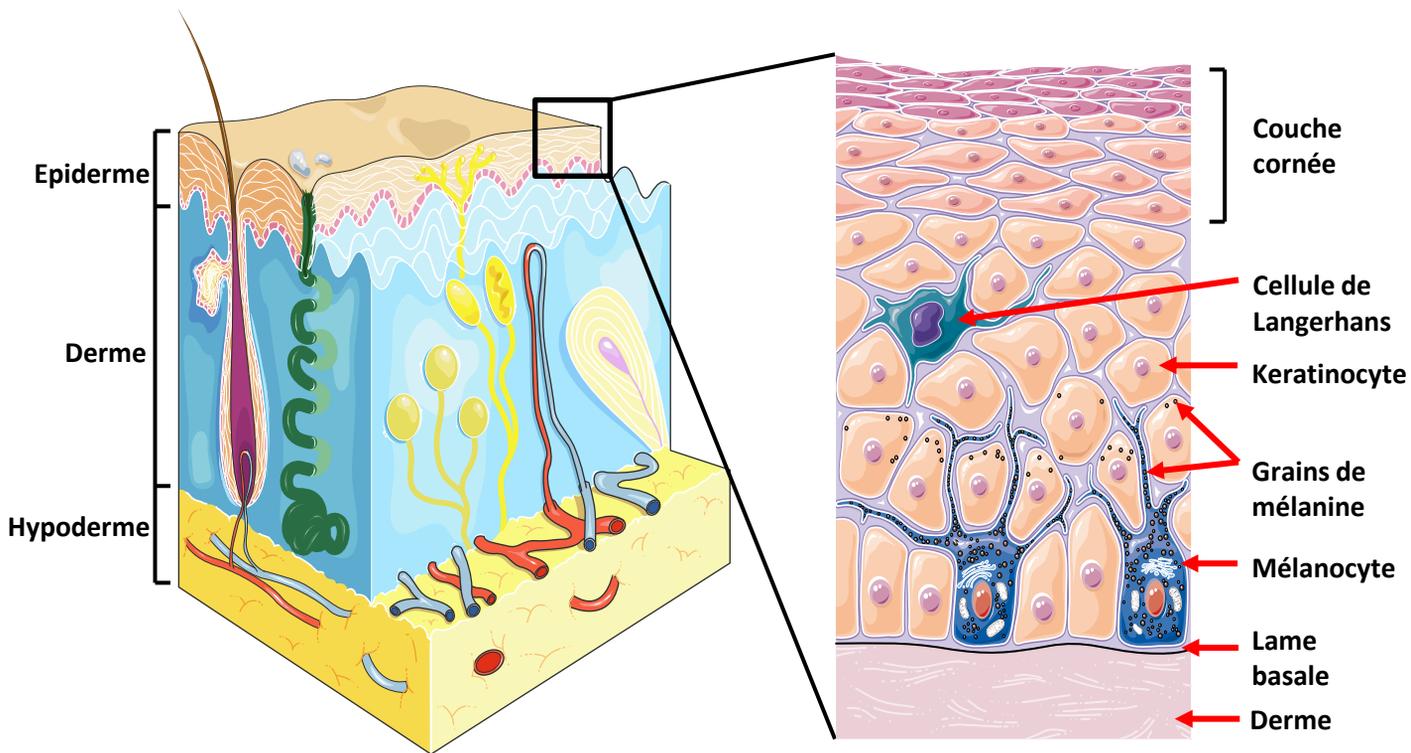


Figure 3 : la peau

Le ratio de ces deux pigments conditionne le phototype cutané et donc la vulnérabilité ou la résistance innée d'un individu aux rayonnements UVs générateurs de dommages à l'ADN (El Ghissassi et al., 2009). L'eumélanine, brune, absorbe totalement la lumière et protège très efficacement l'épiderme, tandis que la phaomélanine, jaune orangée, n'a que peu ou pas de capacités protectrices, voire peut être considérée comme mutagène (Ranadive and Menon, 1986)

Les mélanocytes encapsulent les pigments mélanines qu'ils synthétisent dans des vésicules spécialisées nommées mélanosomes, qui sont ensuite distribués à travers les dendrites jusqu'aux kératinocytes.

b. Un partenaire fondamental : le kératinocyte

L'épiderme est constitué à 85% de kératinocytes, issues de la "couche basale" à la jonction avec le derme. Leur prolifération les pousse progressivement vers l'extérieur, en un long processus passant par un aplatissement, une hyper-kératinisation, la perte de leur noyau et la mort. Cette succession d'étapes forme la "couche cornée", la première barrière de l'organisme au milieu extérieur. La balance desquamation / prolifération des kératinocytes assure l'imperméabilité et l'homéostasie cutanée.

En partenariat avec les mélanocytes, les kératinocytes forment également la première barrière aux UVs : les mélanosomes reçus des premiers s'accumulent aux pôles apicaux des seconds, créant un chapeau protégeant le noyau des rayonnements solaires (Byers et al., 2007). Les kératinocytes se protègent ainsi des dommages à l'ADN et, étant la première ligne de défense cutanée, ils font obstacle à la pénétration profonde des rayonnements : il s'agit du bronzage.

Les kératinocytes participent également à la régulation de la synthèse mélanique: en réponse aux stress UVs, ils sécrètent l'hormone α MSH ciblant les récepteurs MC1R des mélanocytes (Kameyama et al., 1988). Ceci active l'expression du gène MITF induisant la transcription des gènes de la tyrosinase et des autres membres de sa famille (TRP1, TRP2) et la synthèse des mélanines (Bertolotto et al., 1998). L'effet final de cette signalisation permet de faire pencher le ratio des deux types de mélanines vers l'eumélanine.

De plus, les kératinocytes permettent à la peau et aux mélanocytes de garder structure et cohésion : via les jonctions de la cadhérine E, les mélanocytes peuvent s'ancrer aux kératinocytes, ce qui permet, couplé à l'ancrage matriciel, d'assurer l'homéostasie cutanée (Johnson, 1999). Les kératinocytes sécrètent également de nombreux facteurs solubles affectant la régulation et la prolifération des mélanocytes, tel le bFGF (Halaban et al., 1988), l'HGF (Hirobe et al., 2004), le SCF (Hachiya et al., 2004) ou les endothélines 1, 2 et 3 (Imokawa et al., 1997).

c. Les grains de beauté ou naevi

Comme vu précédemment, 25% des mélanomes émergent d'un naevus, un grain de beauté. Constitutivement, un naevus est une hyper-prolifération des mélanocytes et forme une lésion au niveau de l'épiderme et/ou du derme. Suite à ce dérèglement, les cellules vont être régulées par le phénomène de sénescence qui arrêtera la prolifération, formant les naevi.

Cette sénescence suit l'activation d'un ou plusieurs oncogènes (Kaplon et al., 2014), qui induisent la prolifération des cellules. Suite à ce stress permanent, les cellules vont être capables d'enclencher des voies de signalisation activant des gènes suppresseurs de tumeurs qui vont bloquer son cycle cellulaire : c'est l'OIS (Oncogene-induced senescence), qui vient contrer les effets de l'activation des oncogènes (Serrano et al., 1997).

Pendant, cette mécanique de défense face au stress oncogénique n'est pas parfaite, les naevi pouvant ainsi dans certains cas échapper au contrôle cellulaire de l'OIS et réenclencher leur développement tumoral.

3. Les différents types de mélanomes

Figure 4 : Les différents types de mélanomes

Comme tous les cancers, le mélanome présente de nombreuses variations dans son emplacement, son agressivité, et ses causes d'apparition, ce qui permet de les classer en différents types (Porras and Cockerell, 1997; Scolyer et al., 2011).

a. Le mélanome à extension superficielle (SSM)

Les SSM apparaissent généralement chez des patients plus jeunes que pour les mélanomes nodulaires ou lentigo malin, avec un âge médian de 50 ans. Il s'agit du type de mélanome le plus fréquent dans les populations caucasiennes, avec 70 à 80% d'incidence. Il se développe typiquement sur de la peau exposée au soleil par intermittence, telle que celle du tronc, du dos ou des extrémités. Dans la majorité des cas, les SSM se présentent comme une lésion plate et irrégulière, à la croissance lente et avec une pigmentation variable se propageant d'abord de manière radiale avant d'envahir verticalement le derme, présentant alors une zone en relief.

b. Le mélanome nodulaire (NM)

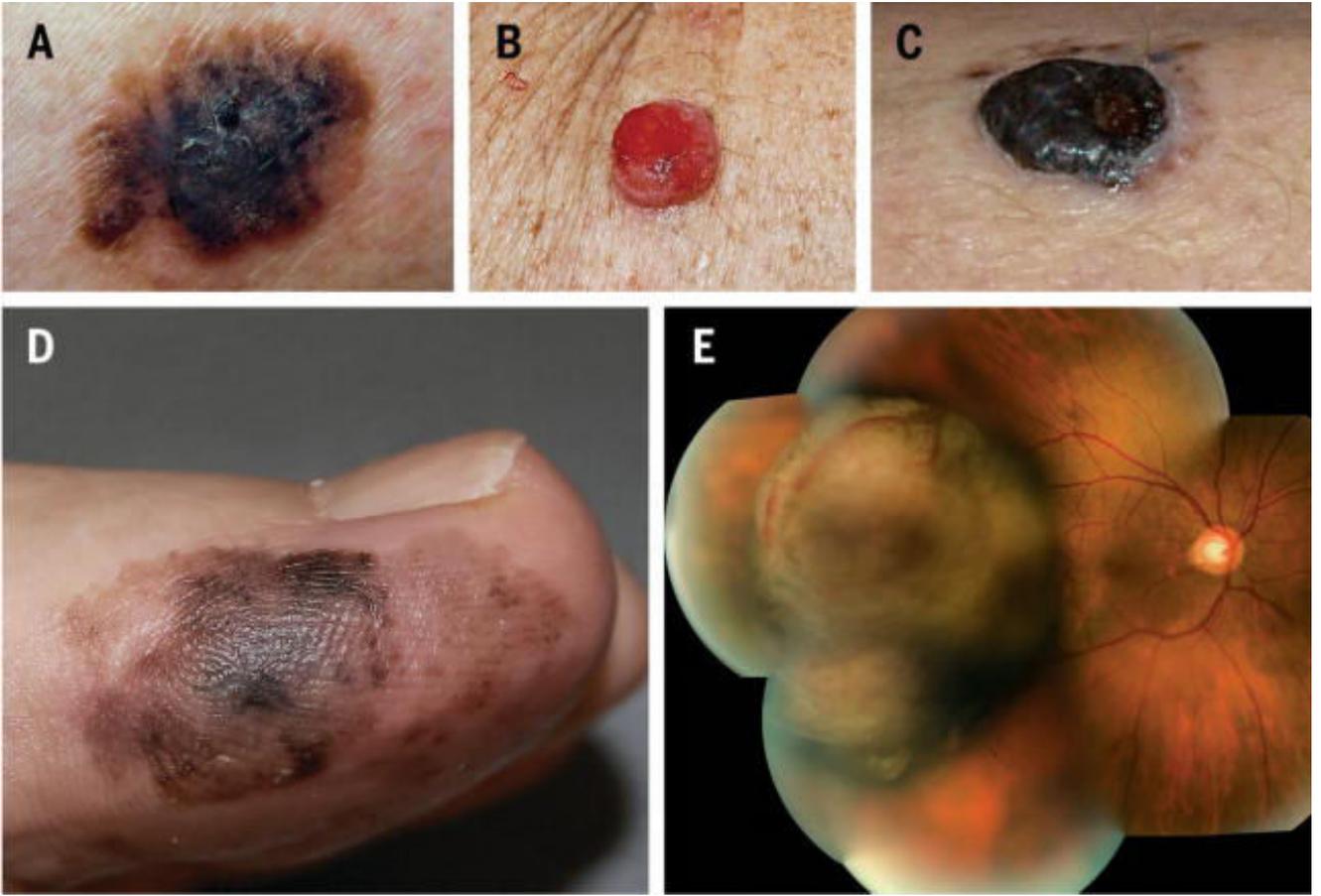


Figure 4 : Les différents types de mélanomes

Issue de (Lo et al, 2014)

Images cliniques de mélanomes. (A) Mélanome à extension superficielle. (B) Mélanome amélanique. (C) Mélanome nodulaire. (D) Mélanome acral-lentigineux. (E) Mélanome uvéal.

Les NM apparaissent chez des patients relativement âgés (âge médian de 70 ans). Ils peuvent apparaître n'importe où et provoquent un nodule à croissance rapide, souvent très pigmenté, qui peut présenter des ulcérations et hémorragies. Ils peuvent facilement être confondus avec d'autres tumeurs cutanées comme des carcinomes, surtout s'ils ne sont pas pigmentés. La vigilance est pourtant de mise car les NM représentent 10 à 20% des mélanomes dans les populations caucasiennes et font partie des mélanomes les plus agressifs.

c. Le mélanome lentigo malin (LMM) ou mélanome de Dubreuilh

Le LMM survient chez les patients âgés (âge médian de 80 ans) et se situe en général sur des zones exposées chroniquement au soleil, telles que la tête, le cou et les avant-bras. Il se présente souvent comme une tache large, à la pigmentation variée et aux bords irréguliers, avec des parties surélevées lorsque l'invasion du derme commence. Cette forme de mélanome est relativement rare, avec 5% d'incidence, et ne présente qu'une faible agressivité.

d. Le mélanome acral-lentigineux (ALM)

L'ALM se développe par définition en "zone acrale", plus précisément les paumes, les plantes de pieds et le dessous des ongles. Similaire au LMM, l'ALM se présente comme une tache à la croissance lente et à la pigmentation irrégulière, avec toutefois une tendance à l'ulcération chronique. Il est très agressif car sa localisation le garde souvent caché jusqu'à un stade tardif. Son développement n'est pas lié aux UVs et son incidence varie de 5% des mélanomes dans les populations caucasiennes à respectivement 35% et 65% dans les populations asiatiques et africaines, faisant de lui le mélanome le plus fréquent dans ces populations.

e. Les mélanomes non-cutanés

Ces formes rares représentent 5% des mélanomes, et peuvent se développer au niveau des muqueuses internes ou de l'œil.

Les mélanomes des muqueuses peuvent survenir au niveau buccal, ano-génital, du nasopharynx ou des sinus. Ils se présentent comme des taches pigmentées sur les muqueuses et sont souvent létaux à cause de la difficulté à les atteindre qui retarde considérablement le diagnostic.

Les mélanomes uvéaux (situés à l'uvée de l'œil, couche supérieure recouvrant la rétine et le corps vitré, comprenant aussi le choroïde, le corps ciliaire et l'iris) se développent à l'intérieur du globe oculaire et ne sont pas visibles extérieurement. Toutefois, des symptômes visuels dus au

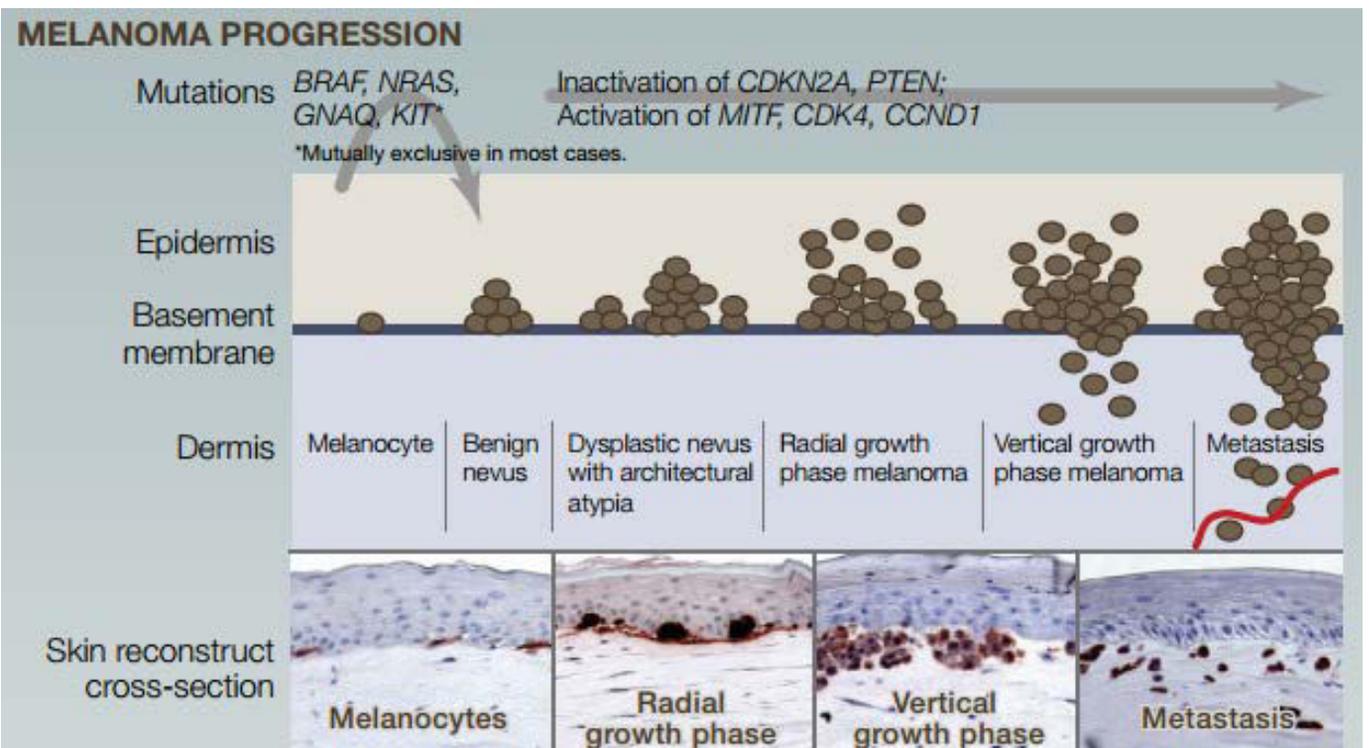


Figure 5 : Du mélanocyte au mélanome métastatique

Issue de Vultur et Herlyn, 2013

décollement partiel de la rétine, tels qu'une baisse d'acuité visuelle, une tache dans le champ visuel, ou des flashes qui se répètent au même endroit et sur le même œil, peuvent indiquer la présence d'une tumeur. Si la tumeur est détectée suffisamment tôt, des traitements existent, permettant de conserver l'œil intact; mais si elle est à un stade trop avancé, seul l'énucléation est envisageable.

Ces deux types de mélanomes ne sont pas liés aux rayonnements UVs, bien qu'en ce qui concerne le mélanome uvéal le phototype est à prendre en considération.

B. La transformation : la Mélanomagenèse

Un mélanome émerge toujours d'un mélanocyte : soit à 75% *de novo* à partir d'une cellule saine, soit à 25% à partir d'un naevus sénescents. Cette transformation d'une cellule somatique en cellule cancéreuse se fait par étapes au cours d'un processus bien défini, la dissémination se faisant tardivement à partir de la tumeur primaire. Ces différentes étapes sont décrites par le modèle de Clark (Clark et al., 1984) et suivent une caractérisation histopathologique (Bennett, 2003; Larue and Beermann, 2007).

Figure 5 : Du mélanocyte au mélanome métastatique

1. L'initiation

Figure 6 : Les altérations génétiques du mélanome

Issue de (Hodis et al., 2012)

Gènes	Fréquence %	Type d'altération
BRAF	63	Mutation
NRAS	26	Mutation
TP53	19	Mutation
PTEN	12	Mutation
	25	Délétion
P16INK4a	19	Mutation
P14ARF	12	Mutation
PPP6C	9	Mutation
RAC1	5	Mutation
MAP2K1	5	Mutation
SNX31	7	Mutation
TACC1	7	Mutation
STK19	4	Mutation
ARID2	9	Mutation

CTNNB1	7	Mutation
PIK3CA	5	Mutation
EZH2	3	Mutation
IDH1	2	Mutation
FBXW7	3	Mutation
KIT	3 6	Mutation Amplification
HRAS	1	Mutation
GNA11	1	Mutation
WT1	3	Mutation
CDKN2A	38	Délétion
TERT	13	Amplification
CCND1	11	Amplification
MITF	4	Amplification
CDK4	3	Amplification

Une tumeur n'émerge pas d'une cellule saine sans raison : différents évènements préliminaires sont nécessaires pour que le cancer survienne. Pour cela, les mécanismes de défense de l'organisme doivent être court-circuités pour permettre à la tumeur de se développer.

Un terrain génétique favorable peut faciliter la transformation. Par exemple, une mutation sur le gène **CDKN2A** prédispose à l'émergence d'un mélanome (Hussussian et al., 1994; Kamb et al., 1994) : ce seul gène codant pour deux importants suppresseurs de tumeur (par épissage alternatif), p16^{INK4a} (inhibitor of kinase a) impliqué dans le contrôle du cycle cellulaire par inhibition de CDK4 et CDK6, et p14^{ARF} (alternative reading frame) contrôle la mort cellulaire par stabilisation du suppresseur de tumeur p53. Ainsi, la seule mutation de **CDKN2A** en fait un gène de prédisposition dans 20 à 40% des cas de mélanomes familiaux (Goldstein et al., 2006).

Indépendamment de son héritage génétique, le mélanocyte doit accumuler suffisamment de mutations et/ou de modifications épigénétiques pour devenir hors de contrôle : nous avons vu précédemment que la seule activation d'un ou deux oncogènes n'était pas suffisante, aboutissant seulement à un naevus par OIS. Ainsi, différentes voies de signalisation régulant le cycle cellulaire, la survie ou l'apoptose sont supposément les acteurs principaux dans la dérégulation aboutissant aux mélanomes. Les principales voies impliquées sont les deux voies majeures en aval de l'oncogène RAS,

la voie des MAP kinases (RAF-MEK-ERK) et la voie PI3K-AKT, ainsi que la voie des suppresseurs de tumeur CDKN2A et p53.

La **voie des MAP kinases** est impliquée principalement dans la survie, la prolifération et la différenciation des mélanocytes. Régulée par les récepteurs tyrosines kinases et les récepteurs couplés aux protéines G (Wellbrock et al., 2004), elle est activée par des facteurs de croissance, des cytokines et des hormones. Elle entraîne l'activation de RAS, une petite protéine G ancrée à la surface interne de la membrane plasmique. RAS recrute alors les protéines de la famille RAF, qui activent à leur tour MEK 1 et 2 qui relaient aux kinases ERK 1 et 2, transloquant au noyau afin d'y réguler les gènes de survie, de prolifération et de différenciation. Si dans le cas de mélanocytes sains l'activation de cette voie reste faible et transitoire, dans le mélanome, elle se retrouve souvent constitutivement activée, avec plus de 90% des mélanomes humains présentant une hyper-activation de la kinase ERK (Cohen et al., 2002). Parmi les mutations les plus fréquentes aboutissant à cette activation constitutive de la voie des MAP kinases nous pouvons citer la mutation somatique de l'oncogène RAS (Albino et al., 1984; Padua et al., 1985), la mutation de NRAS étant retrouvée dans 15 à 30% des mélanomes (les mutations KRAS et HRAS étant plus marginales), ainsi que la mutation de RAF, plus particulièrement BRAF. La mutation somatique de BRAF est la plus représentée car portant sur 50% des mélanomes, avec majoritairement la mutation BRAF^{V600E} (substitution de la valine 600 par un acide glutamique) qui concerne 90% des mutations BRAF (qui peut aussi varier avec les substitutions V600K, D ou R) (Davies et al., 2002), résultant en l'activation constitutive de RAF et par conséquent de la voie entière (Gray-Schopfer et al., 2005). Pour ce qui est de NRAS, la majorité des mutations concernent des mutations faux-sens avec substitution des acides aminés en position 12, 13 ou 61 (Ball et al., 1994; Curtin et al., 2005; van 't Veer et al., 1989). D'autres mutations plus minoritaires affectant la voie des MAP kinases peuvent survenir, telle l'activation du gène KIT sur-activant ERK dans 3% des mélanomes (Willmore-Payne et al., 2005), mais caractéristique des mélanomes acraux et muqueux (respectivement 36 et 39%) (Curtin et al., 2006), ou encore la mutation de RAC1 (RAC1^{P29S}) capable d'activer la voie des MAP kinases suite à des dommages induits par les UVB (Hodis et al., 2012; Krauthammer et al., 2012).

Figure 7 : Activation des ERK en présence de BRAF^{V600E}, NRAS^{mut} et RAC1^{P29S}

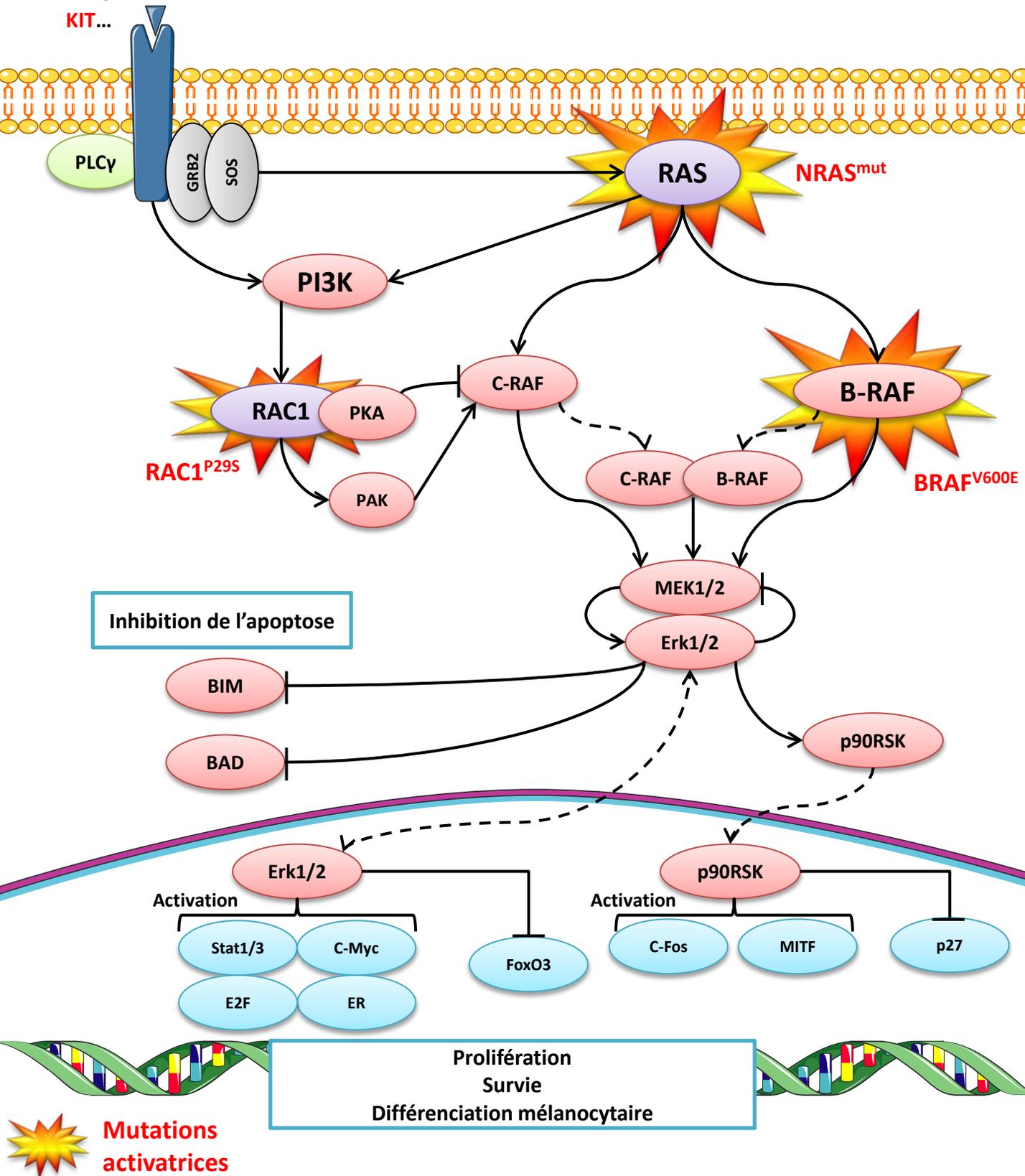
La voie de signalisation **PI3K-AKT** affecte la prolifération, la survie, la migration, l'invasion et le métabolisme énergétique; tous ces rôles étant exacerbés dans le mélanome (Hanahan and Weinberg, 2011). Cette voie est activée par stimulation des récepteurs tyrosine-kinases ou par contact avec la matrice extracellulaire via les intégrines, conduisant au recrutement de PI3K. Une fois activée, PI3K peut phosphoryler les lipides membranaires PIP₂ en PIP₃, ces derniers servant

Récepteurs des facteurs de croissances

Intégrines

RTKs

KIT...



Inhibition de l'apoptose

Mutations activatrices

Prolifération
Survie
Différenciation mélanocytaire

Figure 7 : Activation des ERK en présence de BRAF^{V600E}, NRAS^{mut} et RAC1^{P29S}

d'ancrage à AKT et PDK1. AKT, une protéine sérine/thréonine kinase aux nombreux substrats, peut ainsi être activée après son recrutement par les PIP₃ à la membrane par les kinases de types PDK1 et PDK2. AKT peut être régulée par le suppresseur de tumeur PTEN, qui déphosphoryle les PIP₃ en PIP₂, interférant ainsi avec son recrutement et son activation (Datta et al., 1999). Cette voie est retrouvée hyper-activée dans 41% des mélanomes suite à l'altération génétique ou épigénétique de ses effecteurs (Shull et al., 2012) : PI3K est mutée dans 3% des mélanomes métastatiques (Omholt et al., 2006), PTEN perd sa fonction dans 5 à 20% des mélanomes (Shull et al., 2012; Wu et al., 2003) et AKT est surexprimée dans plus de 60% des mélanomes (Stahl et al., 2004).

Figure 8 : La voie PI3K-AKT

Outre l'induction de voies pro-survie, un mélanome peut également se développer suite à la perte de fonction d'un gène suppresseur de tumeur. Comme dit plus haut, une mutation du gène **CDKN2A** peut déréguler les inhibiteurs de prolifération p16^{INK4a} (impliqué dans le processus de sénescence) et p14^{ARF} (lié à la mort cellulaire dépendante de p53). La mutation somatique de CDKN2A concerne 29% des mélanomes (p16^{INK4a} est muté dans 19% des cas et 12% pour p14^{ARF}) (Hodis et al., 2012). Cette perte de fonction de p16^{INK4a}/p14^{ARF} est une signature du mélanome (comme la voie des MAP kinases) et est présente dans 50% des tumeurs primaires et la quasi-totalité des lignées cellulaires issues de mélanomes (Flores et al., 1996; Walker et al., 1998). De même, en aval de p16^{INK4a} se trouve la protéine CDK4, qui en cas de mutation oncogénique devient insensible à la régulation par p16^{INK4a}. Bien que ne concernant que 3% des mélanomes, cette mutation provoque les mêmes symptômes que les mutants pour **CDKN2A** (Goldstein et al., 2000).

Un autre acteur majeur dans la surveillance anti-cancer est le gène suppresseur de tumeur **TP53**, codant pour le facteur de transcription p53, le "gardien du génome". En aval de la voie de **CDKN2A**, son expression en situation normale est réduite, p53 étant dégradé suite à sa fixation à MDM2, une E3 ubiquitine ligase menant à sa destruction par le protéasome. En cas de stress cellulaire suffisamment fort ou prolongé (dommage à l'ADN, défaut de cycle, dérégulation métabolique etc...), le contrôle exercé par MDM2 est levé, permettant l'accumulation de p53 et l'activation de ses gènes cibles. S'enclenche ainsi en premier lieu un arrêt de cycle pour tenter une réparation cellulaire, qui en cas d'échec mène à la sénescence ou l'apoptose (Yu and Zhang, 2005). De façon générale, **TP53** est muté dans plus de la moitié des cancers humains (Feki and Irminger-Finger, 2004) avec une prévalence de 10 à 20% dans le mélanome pour une mutation "perte de fonction", seule ou couplée à d'autres mutations (Albino et al., 1994; Zerp et al., 1999). La mutation de **TP53** est un évènement récurrent probablement du aux altérations induites par les U.V. (Viros et al., 2014). Cependant, même en absence de mutation directe de TP53, la protéine p53 est souvent

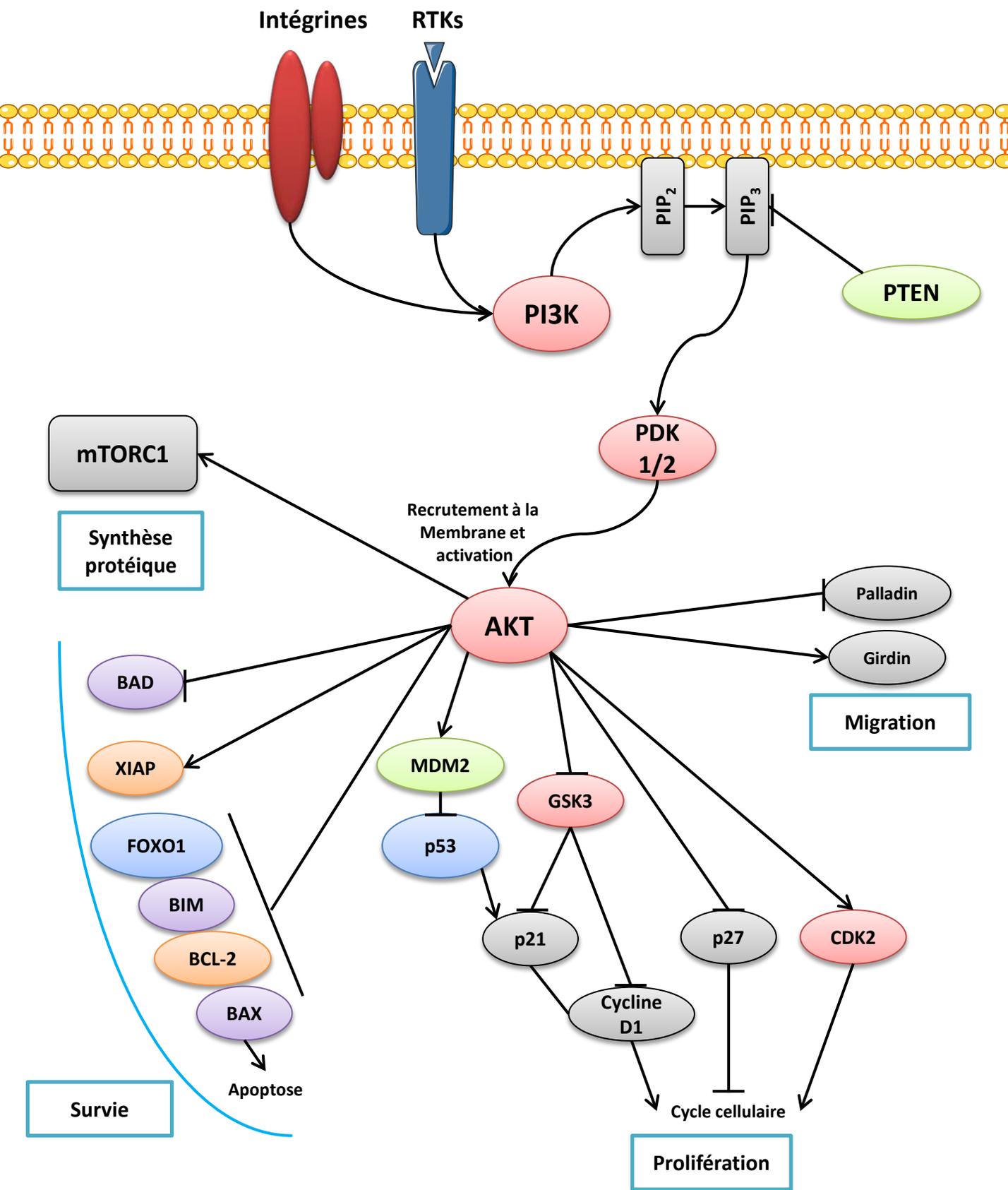


Figure 8 : La voie PI3K-AKT

perturbée comme par l'activation de la voie SPARC-AKT qui la déstabilise (Fenouille et al., 2011) ou par la surexpression de ses inhibiteurs en amont comme MDM2 ou MDM4 (Gembarska et al., 2012; Polsky et al., 2001), cette voie jouant un rôle majeur dans le contrôle de p53 dans le mélanome.

Figure 9 : La voie de p53

Ces dérégulations, seules, ont peu de chance de provoquer l'émergence d'un mélanome. Mais en cas de leur accumulation dans une même cellule, l'équilibre avec les mécanismes de défense peut être rompu : la transformation tumorale commence.

2. La Phase Radiale de Croissance (RGP)

Suite à l'initiation, les mélanocytes en transformation prolifèrent principalement sur leur site de résidence, la peau pour le mélanome cutané. Cette première phase dite "radiale" voit la tumeur mélanocytaire s'étendre dans l'épiderme sans franchir la lame basale, tel un naevus composé de cellules immortelles. Localement, il peut y avoir invasion du derme par des cellules individuelles, mais il n'y a pas d'invasion massive en RGP (Herlyn et al., 1985). Durant cette phase, les proto-mélanomes sont toujours dépendants du soutien physiologique et mécanique des kératinocytes.

En RGP, le mélanome est dit *in situ* et est associé à un bon pronostic clinique : n'ayant pas encore métastasé à travers l'organisme, une simple exérèse chirurgicale large suffit à le retirer complètement. La durée de cette phase est variable, allant de plusieurs décennies pour le mélanome de Dubreuilh (jusqu'à 50 ans) à une durée virtuellement inexistante pour le mélanome nodulaire, qui se développe verticalement dès son apparition.

3. La Phase Verticale de Croissance (VGP)

Succédant à la phase radiale, la phase verticale ou VGP, est le stade critique jouant fortement sur les probabilités de survie des patients : les cellules de mélanomes développent leur autonomie vis-à-vis du microenvironnement généré par les kératinocytes (Haass et al., 2005) et acquièrent les propriétés invasives qui vont leur permettre de digérer la lame basale de l'épiderme et pénétrer le derme. Elles miment ainsi les mécanismes embryonnaires de la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT), et peuvent ainsi proliférer à travers le derme de plus en plus profondément : plus la pénétration est profonde et plus le risque de métastases augmente, réduisant l'efficacité de l'exérèse chirurgicale. Le mécanisme d'EMT sera détaillé plus avant dans sa partie dédiée.

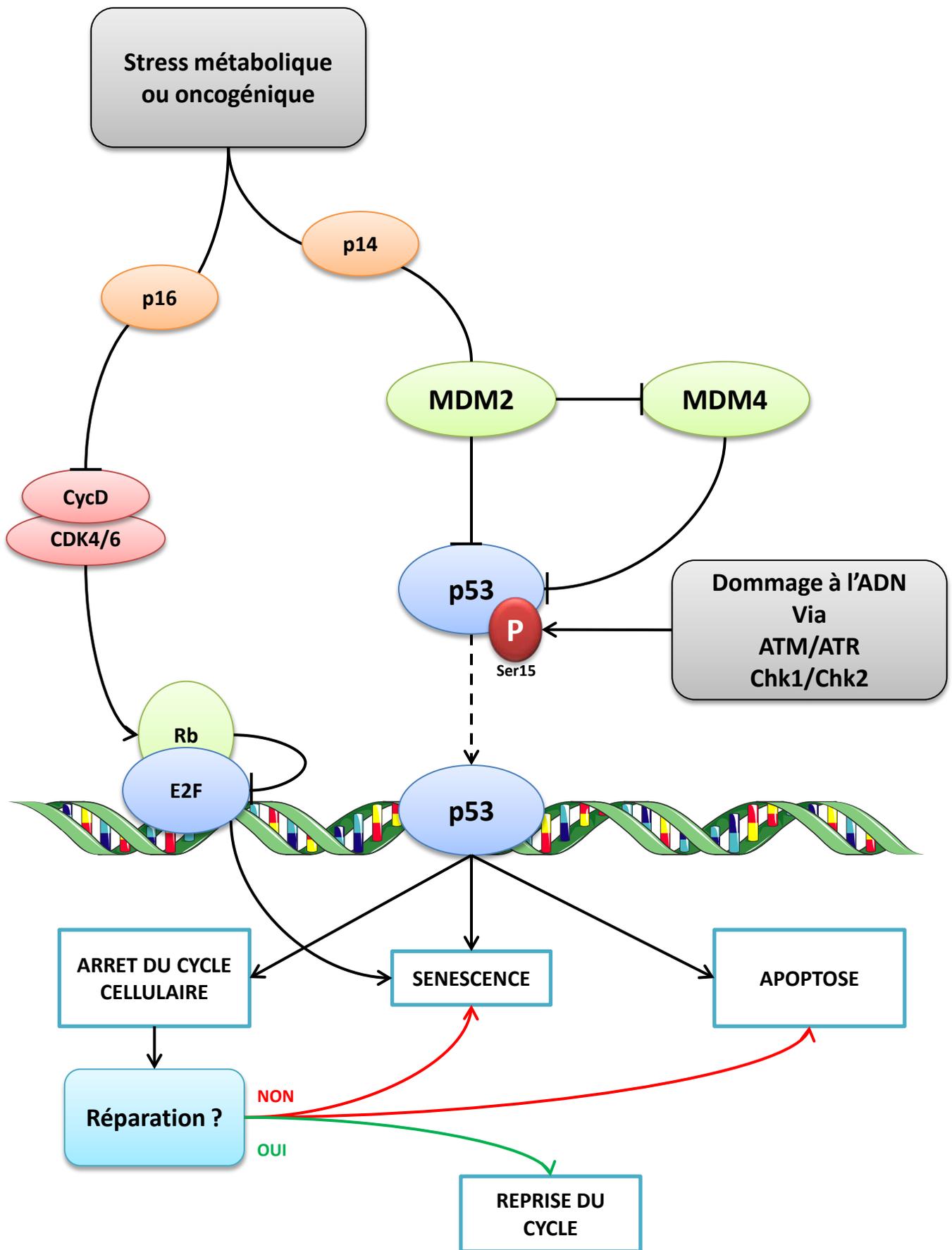


Figure 9 : La voie de p53

4. La Phase métastatique

La formation de métastases est un processus complexe résultant en la dissémination de cellules tumorales du site primaire de la lésion aux différents organes, aboutissant à une forte létalité des patients (Nguyen et al., 2009). Les cellules qui métastasent acquièrent des caractéristiques uniques qui leur permettent de proliférer et de migrer, envahissant les tissus normaux avoisinant, intravasant à travers les membranes basales des vaisseaux sanguins et lymphatiques, survivent dans le flot sanguin ou le système lymphatique, s'arrêtent dans des sites distants, extravasent dans les tissus à distance et prolifèrent, induisant une néo-angiogenèse (Nguyen et al., 2009). En outre des capacités acquises par les cellules cancéreuses, le microenvironnement des sites de formation des métastases fournissent des signaux pro-tumorigéniques, de manière innée ou en réponse à la métastase. Ces signaux favorisent la survie, la migration et la croissance des cellules tumorales dans ces sites secondaires (Klein-Goldberg et al., 2014; Maman et al., 2013).

Dans le cas du mélanome cutané, le site primaire est bien évidemment la peau. Les cellules s'en échappent via une transformation de type épithélio-mésenchymateuse (EMT) : bien que les mélanocytes ne sont pas des cellules épithéliales, les cellules tumorales activent de nombreux programmes liés à l'EMT. Cet événement "EMT-like" du mélanome sera traité plus en profondeur dans la seconde partie de cette introduction. Les métastases s'établissent généralement en un "premier arrêt" dans les ganglions drainant le site de la tumeur primaire (ce qui laisse un dernier espoir chirurgical, par le retrait desdits ganglions), avant de métastaser une seconde fois à distance aux autres organes, suite cette fois à une transition de type mésenchymo-épithéliale (MET), avec une affinité particulière pour le foie, les poumons, le cerveau et les os (Leiter et al., 2004).

Une fois la phase métastatique atteinte, le mélanome n'est plus opérable et seules les thérapies anticancéreuses sont adaptées. Malheureusement, le mélanome est largement insensible aux thérapies classiques (chimiothérapie et radiothérapie), et, s'il est sensible aux thérapies ciblées, entraînant parfois des réponses conséquentes, des résistances aux traitements se mettent rapidement en place et les patients subissent des rechutes fulgurantes. Les différents traitements et les réponses du mélanome à ces traitements seront détaillés plus avant dans la partie qui leur est dédiée.

Figure 10 : La dissémination métastatique

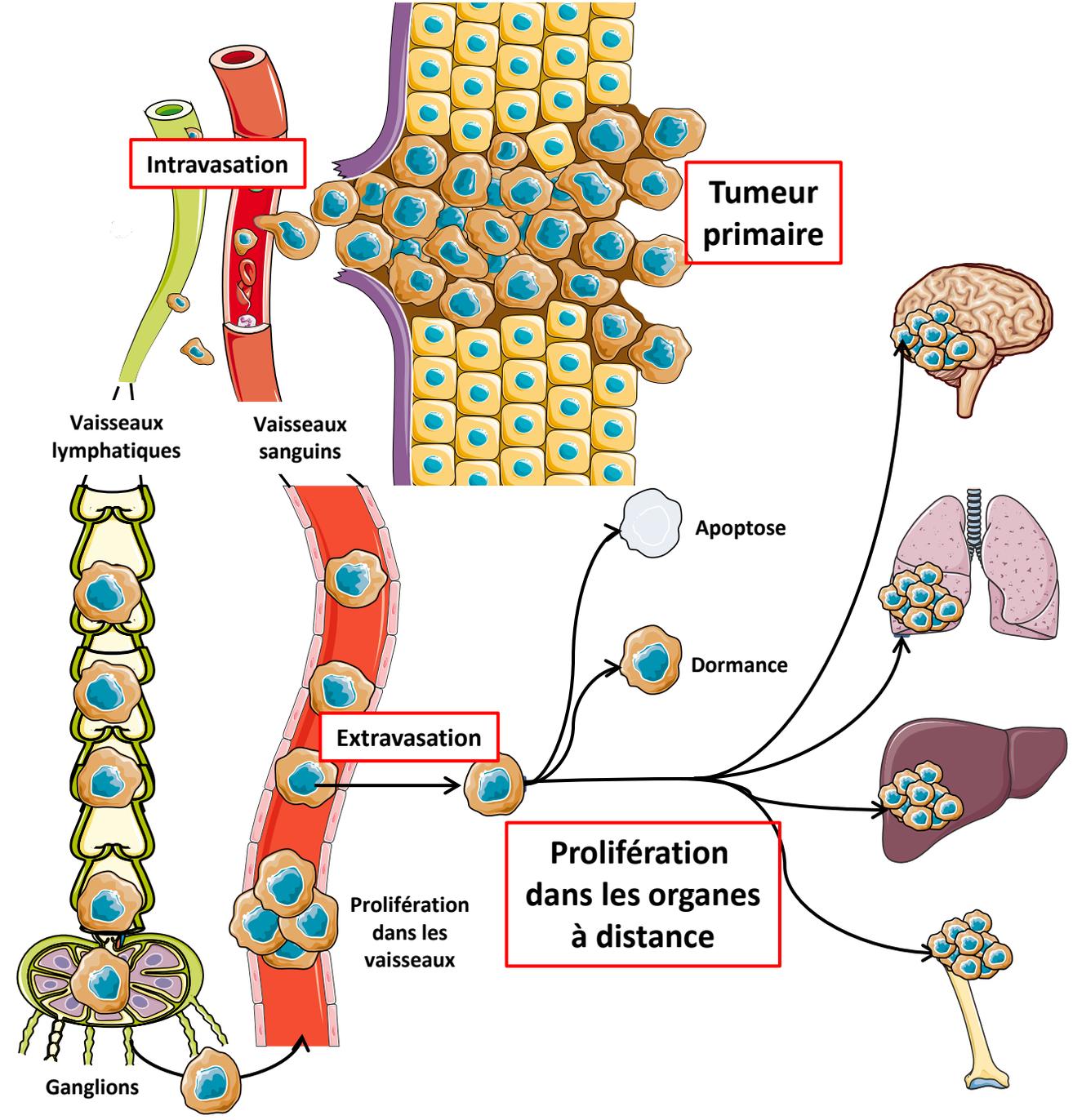


Figure 10 : La dissémination métastatique

Les cellules de mélanomes prolifèrent *in situ* dans la tumeur primaire, avant d'acquies la capacité à envahir le derme et intravaser dans les vaisseaux sanguins et/ou lymphatiques. Une fois dans le système lymphatique, les cellules peuvent coloniser les ganglions drainant le site primaire, puis remonter la chaîne ganglionnaire ou rejoindre la circulation sanguine. De là, les cellules qui survivent sont capables d'extravaser et de proliférer, générant des métastases dans des organes à distance.

C. Le microenvironnement tumoral

La recherche sur le cancer se focalise sur les cellules tumorales elles-mêmes, mais en réalité ces cellules ont besoin pour survivre, proliférer et métastaser d'un site primaire spécifique et d'un site d'arrivée permissif : des niches spécifiques, constituées d'un ensemble de cellules, de facteurs sécrétés (hormones, facteurs de croissance, chimiokines, etc.) et d'une matrice extracellulaire (MEC), qui travailleront en partenariat avec la tumeur. Ce microenvironnement, ou stroma, influence et est influencé par les cellules cancéreuses (Joyce and Pollard, 2009) et est indissociable du développement tumoral. Son passage d'une homéostasie normale, hostile au cancer, à un stroma tumoral permissif est une étape clef du développement de la maladie. Pour revue (Attieh and Vignjevic, 2016).

1. De nombreux acteurs

Le microenvironnement joue de nombreux rôles dans la tumorigenèse et la progression tumorale. Il est composé de différents constituants :

- Les cellules avoisinantes forment la composante cellulaire, c'est à dire les cellules résidentes du tissu et de leur environnement direct : les fibroblastes, les cellules endothéliales et vasculaires, les cellules immunitaires ...

- La matrice extracellulaire dans laquelle baigne la composante cellulaire, élément fondamental du stroma, qui permet aux dites cellules de s'ancrer durablement à ses différents composants ou au contraire de migrer et de se déplacer à travers elle. La MEC elle-même constitue un gel hydraté composé de macromolécules (acide hyaluronique, protéoglycannes), de protéines fibrillaires (collagènes) et structurales (laminines, fibronectines, etc.), chacun de ces composants étant capable d'interagir avec les cellules et de moduler leur fonction.

- Les facteurs solubles, sécrétés *in situ* ou à distance par de nombreuses cellules et pouvant moduler et remodeler le stroma. Ces molécules peuvent activer de nombreuses voies de signalisation, affectant le cycle cellulaire, la morphologie et la polarité cellulaire, l'ancrage à la MEC etc. Elles servent également à attirer par chimiotaxie la migration cellulaire, tel le recrutement du système immunitaire ou la néoangiogenèse.

Physiologiquement, le microenvironnement joue un rôle suppresseur de tumeur, mais il peut être remodelé pour être permissif à l'invasion et à l'établissement des cellules cancéreuses.

Figure 11 : Le stroma

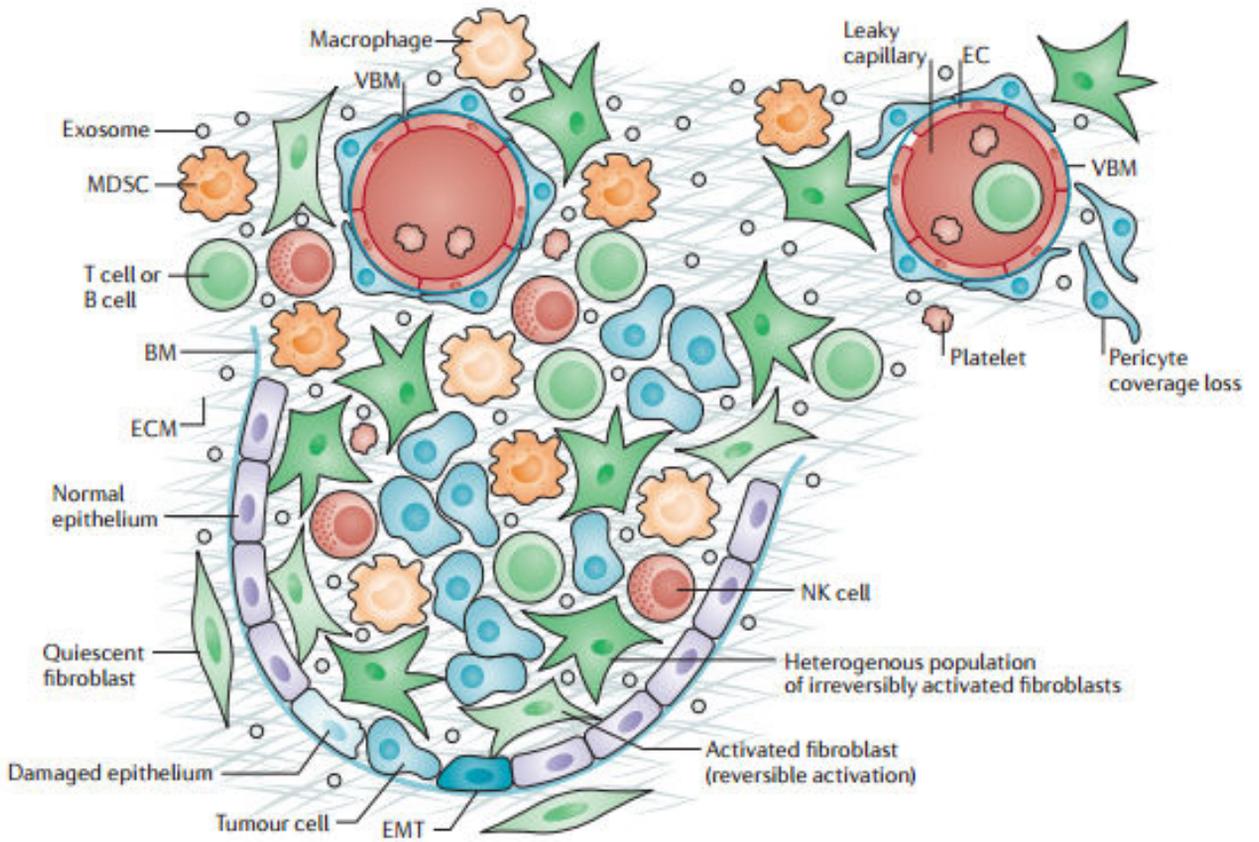


Figure 11 : Le stroma
 Issue de (Kalluri 2016)

2. Les Fibroblastes, coordinateurs du microenvironnement

Les fibroblastes sont des cellules allongées, résidentes du stroma de nombreux tissus, et les principaux producteurs de la MEC. Ils sont proches dans leurs caractéristiques des cellules mésenchymateuses et, dans le contexte d'une blessure, leur rôle dans la contraction des tissus les rapproche des muscles lisses (Gabbiani et al., 1971; Hirschel et al., 1971; Majno et al., 1971). Cependant, il n'a toujours pas été découvert de marqueurs spécifiques des fibroblastes capables de définir leur population. Ils ne sont définis que par leur forme, l'absence de marqueurs d'autres types cellulaires et l'expression d'une combinaison de marqueurs appartenant aux cellules mésenchymateuses et aux muscles lisses (α SMA, PDGFR, vimentine et desmine).

Physiologiquement, dans les tissus adultes normaux, les fibroblastes sont quiescents dans le stroma; leur période d'activité maximale ayant lieu au cours de la croissance embryonnaire, lorsque toutes les matrices de l'organisme sont produites (Powell et al., 2005). Ainsi, dans des tissus adultes, les fibroblastes sont activés dans des situations très spécifiques, telles l'inflammation tissulaire, la fibrose, et au cours de la guérison d'une blessure. Dans ces cas, les fibroblastes s'activent, étant alors qualifiés de myofibroblastes d'après l'augmentation de leurs capacités contractiles, permettant un remodelage de la matrice nécessaire à la réparation des tissus. Une fois la blessure réparée, ils reviennent à leur état inactif ou opèrent une apoptose.

Une autre possibilité d'activation des fibroblastes est leur association à des cellules tumorales.

3. Les Fibroblastes associés aux Cancers (CAFs)

Situés au niveau d'une tumeur, les fibroblastes activés sont qualifiés de Fibroblastes Associés aux Cancers ou CAFs (Cancer-Associated Fibroblasts) (Kalluri and Zeisberg, 2006). Originellement considérés comme une simple conséquence du développement cancéreux, il a depuis été montré qu'ils contribuaient activement à la croissance tumorale et aux processus d'invasion et de métastase (Bissell and Hines, 2011). La difficulté à identifier la population fibroblastique fait que l'origine précise des CAFs n'est pas connue, ceux-ci pouvant simplement émerger des fibroblastes résidents (Albregues et al., 2015; Avgustinova et al., 2016; Calvo et al., 2013; Kojima et al., 2010), être issus des cellules souches mésenchymateuses recrutées depuis la moelle osseuse (Karnoub et al., 2007; Lu et al., 2013; Shinagawa et al., 2013; Talele et al., 2015), provenir de cellules complètement différentes transformées par la tumeur (Ross et al., 1974), voire directement de cellules cancéreuses

ayant subi une EMT (Radisky et al., 2007; Rowe et al., 2009; Schulte et al., 2012). La diversité des CAFs et de leurs fonctions s'explique peut-être par ces origines multiples.

Dans le cas particulier du mélanome, on parle de fibroblastes associés au mélanome (ou MAFs) pour les fibroblastes activés présents au niveau de la tumeur primaire, ceux-ci étant impliqués dans l'initiation et la progression de la pathologie (Balsamo et al., 2009; Lee and Herlyn, 2007; Wandel et al., 2002). Il a même été montré *in vitro* dans ce cas précis que des fibroblastes normaux exposés à des facteurs solubles de cellules de mélanomes enclenchent une réponse pro-inflammatoire et invasive, capable de promouvoir à leur tour la croissance et la migration des mélanomes via des chimiokines et des facteurs de croissance (Gallagher et al., 2005; Wandel et al., 2002).

Recemment, les agents responsables de l'activation des MAFs par les mélanomes ont pu être plus clairement identifiés : les mélanosomes et les exosomes transmettent divers facteurs des cellules cancéreuses aux fibroblastes du stroma, provoquant leur transformation. Parmi ces facteurs, le microARN miR-211 semble être particulièrement important, son import aux fibroblastes par les mélanosomes provoquant la répression du suppresseur de tumeur IGF2R et activant la voie des MAPK (Dror et al., 2016; Garcia-Silva and Peinado, 2016).

Figure 12 : Fibroblaste normal versus Fibroblaste activé

D. Le traitement du mélanome

De par sa grande hétérogénéité au niveau de sa forme, son agressivité et sa vitesse de développement, il n'existe pas aujourd'hui de traitement ou de prise en charge unique contre le mélanome. Cette partie sera dédiée aux différents moyens de prévention, de détection et de traitement du mélanome cutané.

1. La prévention

Outre les prédispositions génétiques, le principal facteur de risque responsable du développement d'un mélanome est l'exposition aux UVs solaires. La responsabilisation, la prise de conscience des comportements à risques et les bons réflexes face à l'exposition au soleil sont donc primordiaux dans la lutte anti-mélanome pour prévenir son apparition.

Un comportement prudent est recommandé en période estivale ou dans des zones géographiques fortement ensoleillées (Afrique, Australie, en mer et montagne...). Il est également conseillé de ne pas s'exposer entre 12 et 16h en période estivale, ni aux heures les plus chaudes le

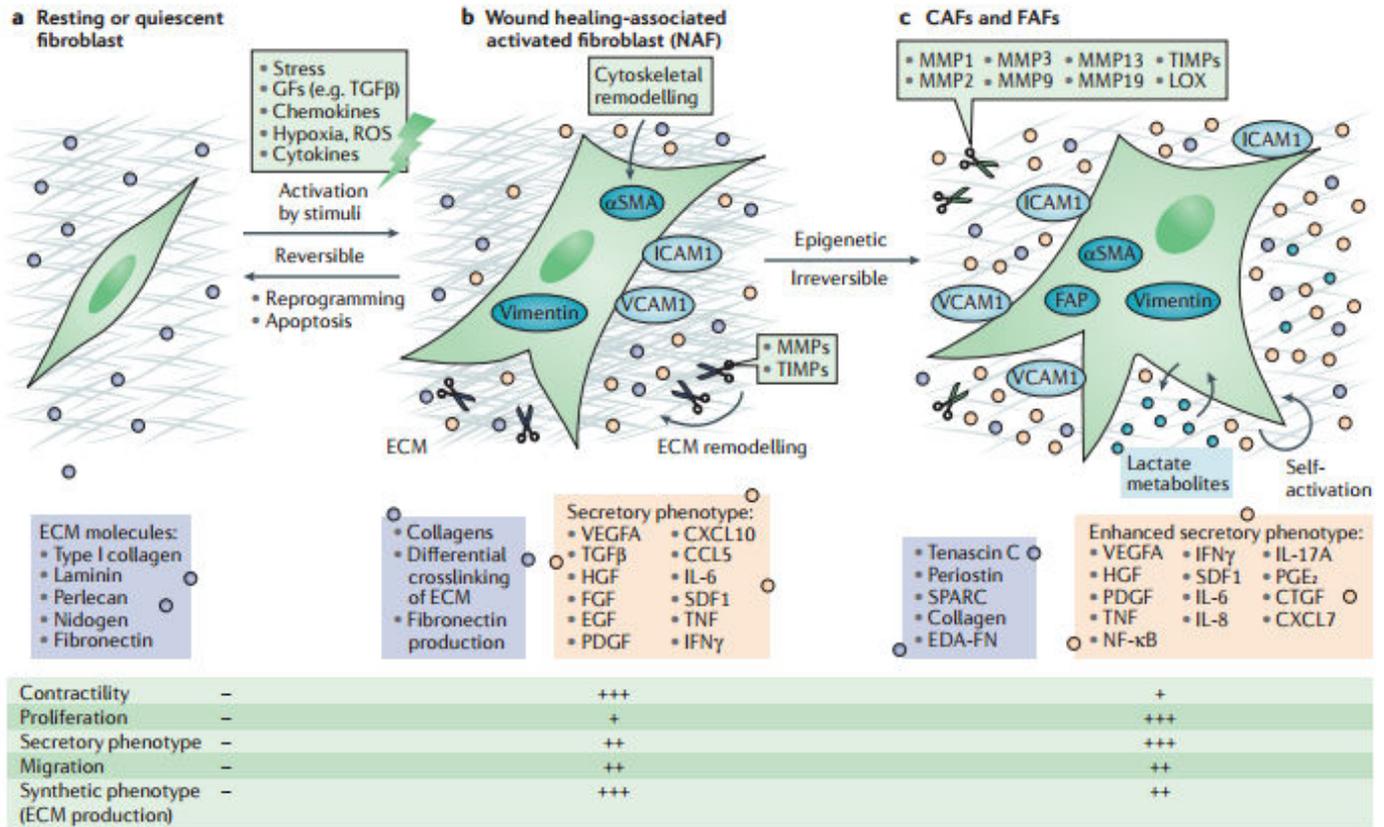


Figure 12 : Fibroblaste normal versus Fibroblaste activé

Issue de (Kalluri 2016)

reste de l'année; d'appliquer régulièrement de la crème solaire indice 30 ou supérieur lors des expositions (toutes les deux heures ou après chaque baignade), de porter des vêtements couvrants et des accessoires de protection (lunettes de soleil, chapeau...) pour les peaux les plus claires et les enfants (âge crucial conditionnant la peau pour la vie entière).

2. Le diagnostic : importance de la surveillance

La détection du mélanome est peut-être le facteur le plus déterminant du taux de survie des patients : le programme américain SEER (Surveillance, Epidemiology and End Results Program) établissait des taux de survie à 5 ans selon l'épaisseur de la tumeur, avec 98% pour les tumeurs restreintes au stade localisé, 61,9% pour celles présentant une extension régionale, et chutant à 15,3% une fois le stade métastatique atteint (avec une moyenne de survie de 6 à 9 mois) (Horner et al., SEER Cancer Statistics Review, 1975-2006).

Il est donc primordial de diagnostiquer très tôt le développement d'un mélanome, et cela repose sur l'auto-surveillance et la consultation régulière d'un professionnel de la santé spécialisé en dermatologie. Contrairement à la majorité des cancers, sa détection à l'œil nu est relativement aisée, et chacun devrait surveiller sa peau régulièrement pour en identifier la possible apparition (tous les 3 mois pour les individus à risque de phototype I et II). De même, la consultation régulière d'un dermatologue est conseillée (une fois par an minimum pour les individus à risque), en rapportant toute évolution inquiétante.

La vigilance est de mise car un mélanome cutané peut se développer n'importe où sur la peau, même en des endroits difficiles d'accès, tels le cuir chevelu, les organes génitaux, les espaces interdigitaux, etc.

Figure 13 : La règle ABCDE

Pour distinguer un simple grain de beauté bénin d'un mélanome émergeant, différents critères morphologiques sont à considérer. Il s'agit de la Règle ABCDE, listant les critères comme suit :

- Asymétrie : forme différente d'un rond ou ovale, non symétrique dans sa forme ou couleur par rapport à son centre.
- Bords irréguliers : limite entre le naevus et l'épiderme mal définie, déchiquetée.
- Couleur non homogène : plusieurs couleurs mélangées au sein du même naevus (noir, bleu, marron, rouge ou blanc).
- Diamètre : augmentation de la taille du naevus, dépassant les 6 mm.
- Evolution : tout changement rapide d'un des facteurs précédents.



A - Asymétrie

Les mélanomes sont souvent irréguliers, avec une forme non symétrique. Les grains de beauté bénins sont généralement symétriques.



B – Bords irréguliers

Typiquement, les grains de beauté non-cancéreux ont des bords lisses et réguliers. Les mélanomes ont généralement des bords irréguliers et aux frontières peu définies.



C - Couleur

La présence de plus d'une couleur (bleue, noire, marron, blanche...) ou la distribution irrégulière de couleurs peut être un signe de présence d'un mélanome. Les grains de beauté sont généralement d'une seule teinte.



D - Diamètre

Les mélanomes ont souvent un diamètre supérieur à 6 mm.

E - Evolution

L'évolution d'un grain de beauté est devenu le facteur le plus important pour le diagnostic d'un mélanome. Connaître ce qui est normal pour soi-même est déterminant, tout changement par rapport à la norme personnelle doit être montré à un dermatologue.

Figure 13 : La règle ABCDE

Toute présence de l'un de ces critères n'est pas signe de l'émergence d'un mélanome, mais elle réclame un examen dermatologique urgent.

Si le dermatologue identifie un naevus ou une tache pigmentée inquiétante, il procédera systématiquement à un prélèvement (biopsie) afin de faire réaliser des analyses anatomo- et histopathologiques. Ces analyses permettront la caractérisation complète du prélèvement, avec infirmation ou confirmation de sa nature maligne et, le cas échéant, le stade de son développement tumoral : l'ensemble des paramètres TNM (Thickness, lymph Node and Metastasis) définissent l'indice de BresLow servant de principal facteur de pronostic. Le paramètre T définit l'épaisseur de la tumeur (la profondeur de la cellule maligne la plus avancée) et l'ulcération; le paramètre N s'intéresse aux métastases des ganglions lymphatiques (nombre de ganglions affectés et type de métastases); et enfin le paramètre M recense les métastases à distance.

Figure 14 : La classification TNM

Selon les résultats de l'étude du prélèvement, différentes thérapies seront disponibles, dépendant de l'avancement et du statut mutationnel de la pathologie.

3. L'exérèse chirurgicale : le meilleur traitement mais aussi le plus limité

Lorsque la tumeur est détectée suffisamment précocement (avant d'avoir métastasé en dehors du site primaire), le premier traitement effectué est le retrait par exérèse chirurgicale de la zone affectée (souvent sous simple anesthésie locale). En fonction de la profondeur de la tumeur (critère T de BresLow >3mm), jusqu'à 3 cm de marges seront pris par l'exérèse depuis le centre de la lésion, afin de maximiser les chances d'éradiquer la totalité des cellules malignes. Ce cas est le seul où la guérison totale est possible et fréquente, avec toutefois une surveillance accentuée du patient pour le reste de sa vie.

Malheureusement, une fois le stade métastatique atteint, l'efficacité du traitement chirurgical devient nulle : même si le retrait du site primaire reste systématique afin de ralentir le développement du mélanome, ce n'est plus suffisant pour assurer la guérison. Assez fréquemment, en cas de tumeurs profondes non disséminées, les chirurgiens tentent de retirer quelques ganglions lymphatiques sentinelles drainant le site primaire, à la recherche de micro-métastases précoces. S'il y en a de détectées, la chaîne entière de ganglions drainant le site primaire est retirée (pour revue (Garbe et al., 2010; Testori et al., 2009)).

Critère T (Thickness)			Critère N (Lymph Node)			Critère M (Metastasis)		
	Épaisseur de la tumeur (BresLow)	Paramètres supplémentaires		Nombre de ganglions lymphatique envahis	Etendues de métastases dans les ganglions lymphatiques		Type de métastases à distance	Lactate déshydrogénase sérique (LDH)
Tis	n/a	Melanome <i>in situ</i> , non invasif	N0	0	n/a	M0	Pas de métastases	n/a
T1	≤1.0 mm	a : pas d'ulcération, pas de mitose b : ulcération ou taux mitotique ≥ 1/mm ²	N1	1	a : micrométastases b : macrométastases	M1a	Peau, tissus sous-cutanés ou ganglions lymphatiques	Normal
T2	1.01–2.0 mm	a : pas d'ulcération b : ulcération	N2	2-3	a : micrométastases b : macrométastases c : métastases satellites ou en transit	M1b	Poumons	Normal
T3	2.01–4.0 mm	a : pas d'ulcération b : ulcération	N4	≥4, ou métastases satellites ou en transit et ganglions lymphatiques atteint		M1c	Toute autre métastase à distance	Normal élevé
T4	>4.0 mm	a : pas d'ulcération b : ulcération						

Figure 14 : La classification TNM

Adaptée de (Garbe et al, 2010)

Lorsque des métastases à distance sont détectées, leur exérèse est réalisée quand elles sont accessibles et que leur retrait ne comporte pas de risque pour le patient. Cependant, une fois que leur dissémination est trop étendue ou complexe, la chirurgie n'est plus considérée comme une option et d'autres thérapies sont considérées.

4. Les thérapies contre les mélanomes métastatiques

a. Les thérapies classiques

Les thérapies généralistes contre le cancer, les chimiothérapies et la radiothérapie, sont applicables aux mélanomes. Cependant, leur impact est faible, le mélanome devenant rapidement résistant à leur action.

La chimiothérapie de référence contre le mélanome est l'agent alkylant Dacarbazine/Déticène, sur le marché depuis 1975, mais dont le taux de réponse associé ne dépasse pas 10%, sans amélioration de la survie. Son mode d'action passe par un effet cytostatique non sélectif, arrêtant la croissance cellulaire et inhibant la synthèse d'ADN. L'utilisation de cette chimiothérapie est actuellement mise à l'arrêt au profit d'autres thérapies plus efficaces et avec moins d'effets secondaires.

La radiothérapie n'est que peu utilisée dans le cas du mélanome. Elle est prescrite pour cibler la tumeur primaire et les ganglions lymphatiques envahis lorsque la localisation de ceux-ci les rend inopérables par exérèse. Elle est aussi utilisée en palliatif pour atténuer la douleur générée par les métastases osseuses et cérébrales.

Ces thérapies n'offrent ainsi pas de réel espoir de guérison, ce qui explique que le mélanome a longtemps eu la réputation d'un cancer incurable. Mais ces dernières années, de nouvelles thérapies plus efficaces ont été développées, qui, si elles n'assurent pas la guérison systématique, permettent d'augmenter l'espérance de vie des patients.

b. L'immunothérapie

Figure 15 : Mécanisme d'action des immunothérapies anti CTLA4 et PD1/PDL-1

Le concept derrière l'immunothérapie est de laisser l'organisme se débarrasser de la pathologie qui l'affecte, le traitement n'étant là que pour apporter un "coup de pouce", afin de mobiliser et diriger les défenses dans la bonne direction. Dans les cas des cancers et du mélanome, il s'agit d'induire la réponse immunitaire contre les cellules tumorales : celles-ci, bien que reconnues

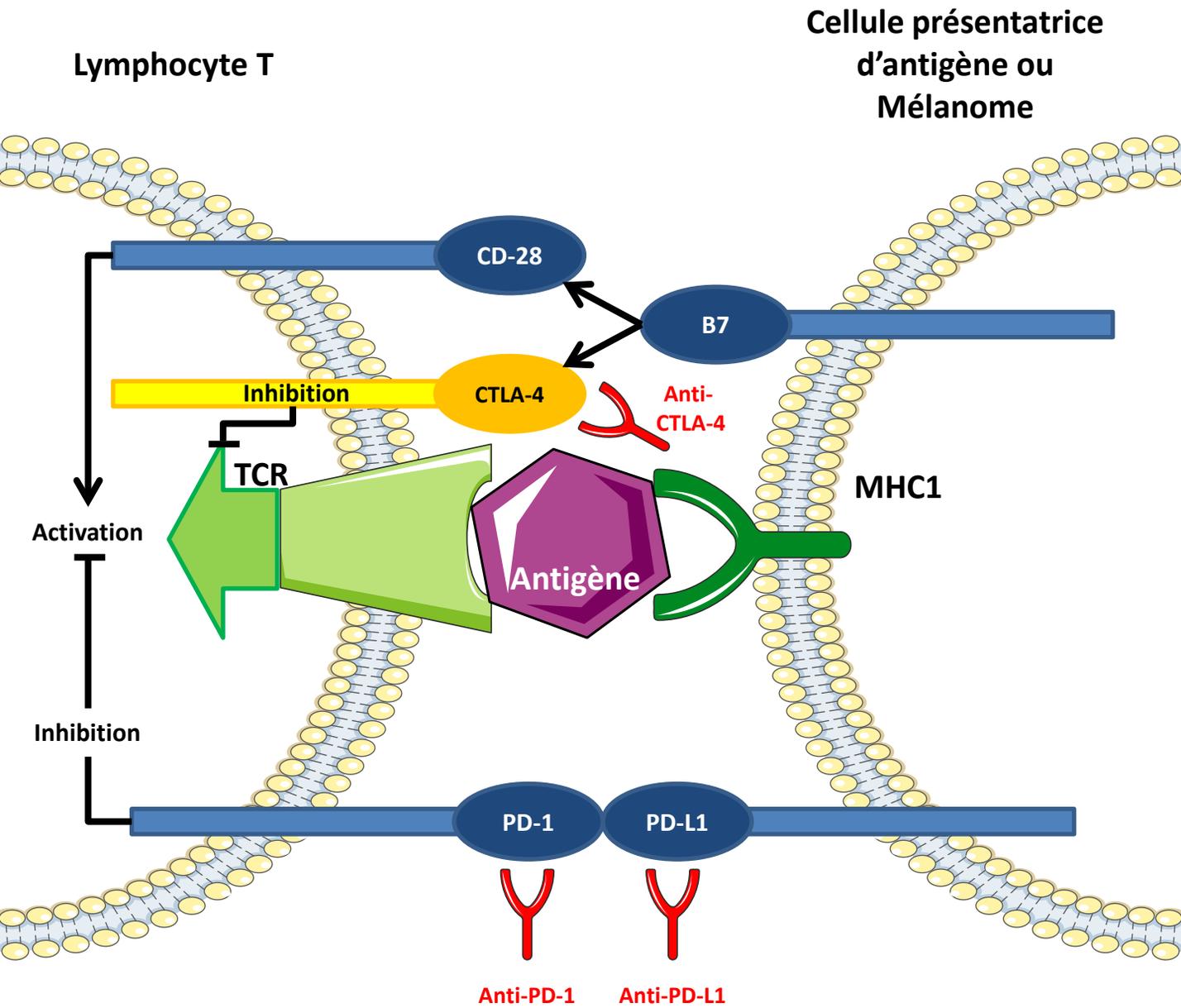


Figure 15 : Mécanisme d'action des immunothérapies anti CTLA4 et PD1/PDL-1

comme non-soi par l'organisme, ne sont pas reconnues assez vite et ne déclenchent pas de réponse assez forte. Cette capacité à échapper au système immunitaire s'explique notamment par la capacité des cellules cancéreuses à inhiber l'activation des lymphocytes T via l'expression à leur surface de certains ligands spécifiques. La stratégie immunothérapeutique pour combattre le mélanome est d'interférer avec cette interaction inhibitrice entre la cellule tumorale et le lymphocyte T. Trois médicaments prometteurs sont en développement, les anti-CTLA-4 et les anti-PD1/anti-PD-L1.

L'approche par CTLA-4 cible le récepteur situé à la membrane des lymphocytes T et reconnaît le ligand B7 des cellules présentatrices d'antigènes. En compétition avec un autre récepteur des lymphocytes T, le CD28, la liaison avec B7 définit l'activation de la cellule : la liaison CD28 - B7 active le lymphocyte T tandis que la liaison CTLA-4 - B7 l'inhibe. Ainsi, en mimant cette dernière activation, les cellules tumorales désactivent les lymphocytes T. La thérapie consiste à injecter au patient des anticorps monoclonaux anti-CTLA-4 qui viennent empêcher l'inhibition et potentialisent l'activation de la réponse immunitaire (Eggermont et al., 2016; Robert and Ghiringhelli, 2009). Deux anticorps monoclonaux anti-CTLA-4 existent sur le marché : l'Ipilimumab et le Tremelimumab. Mais si ces thérapies sont efficaces jusqu'à un certain point, au bout du compte, peu de patients sont répondeurs, le traitement est long à faire effet (>3 mois), et de nombreux effets secondaires peuvent survenir (prurits, éruptions, diarrhées, colites,...).

Comme CTLA-4, la protéine PD-1 est un récepteur situé à la membrane des lymphocytes T. Il est stimulé par sa liaison avec son ligand PD-L1 (B7-H1), exprimé notamment par les mélanomes (Zou and Chen, 2008). Son activation inhibe l'activité anti-tumorale des lymphocytes T (pour revues (Homet Moreno and Ribas, 2015; Zavala and Kalergis, 2015). Ainsi, en bloquant la protéine PD-1 par des anticorps monoclonaux, l'interaction avec PD-L1 est empêchée, menant à la réactivation de lymphocytes T anti-tumoraux. Deux traitements existent, le Nivolumab et le Pembrolizumab.

Pour ce qui est de combattre le mélanome, il semble que la meilleure réponse des immunothérapies ait lieu lors de l'association simultanée ou séquentielle des anti-CTLA-4 et des anti-PD1/anti-PD-L1, telle l'association Nivolumab / Ipilimumab (Wolchok et al., 2013) ou l'utilisation de Nivolumab ou Pembrolizumab en cas de mélanomes métastatiques réfractaires à l'Ipilimumab (Robert et al., 2014).

c. Les thérapies ciblées

Les thérapies ciblées s'attaquent spécifiquement à l'inhibition de voies de signalisation déterminées, à la différence des thérapies classiques, au spectre plus large. Cette précision d'action réduit énormément les effets secondaires du traitement par rapport aux thérapies classiques. Les plus prometteuses de ces nouvelles thérapies ciblées sont celles affectant la signalisation de la voie des MAP kinases (RAF-MEK-ERK), les mélanomes exprimant les formes mutées de BRAF (V600E/K/D/L) étant les plus répandus.

Plusieurs inhibiteurs de la mutation BRAF^{V600} existent sur le marché, affectant uniquement les cellules portant la mutation, tels les mélanomes, sans effet sur les cellules saines. Parmi eux, le Vémurafénib (Zelboraf, PLX) et le dabrafénib (Tafinlar, GSK2118436), inhibent les formes mutées de BRAF par compétition avec le site de liaison à l'ATP de son domaine kinase.

Si l'efficacité de ces traitements pour le mélanome métastatique est avérée, avec un taux de réponse de 50 à 60% chez les patients mutés BRAF, tous ne sont malheureusement pas répondeurs et des mécanismes de résistance apparaissent chez 50% des répondeurs.

De plus, même si les anti-BRAF^{V600} n'ont pas d'effet inhibiteur sur les cellules saines ou les cellules tumorales non porteuses de la mutation, des effets "secondaires" peuvent apparaître avec, paradoxalement, une activation de la voie des MAP kinases provoquant prolifération et migration cellulaire dans les tumeurs porteuses de mutations différentes. D'autres effets secondaires peuvent être observés, tels des arthralgies, une asthénie, une alopecie, des nausées et des désordres cutanés pouvant aller jusqu'à l'émergence de carcinomes. Cependant, ces effets secondaires sont bien moins fréquents que ceux observés lors des thérapies classiques, le plus grand danger venant de l'acquisition de résistances aux traitements.

Figure 16 : Traitement d'un mélanome aux inhibiteurs de BRAF et rechute

Toujours dans le cas d'un statut mutationnel BRAF^{V600}, les inhibiteurs de MEK peuvent être utilisés : lorsque les cellules tumorales deviennent résistantes aux inhibiteurs de BRAF^{V600}, c'est dans 70% des cas suite à une réactivation des kinases ERKs (Shi et al., 2014). Ainsi, l'association des inhibiteurs de MEK, tel le Cobimetinib et le Trametinib, aux traitements anti-BRAF^{V600} permet d'augmenter significativement la moyenne de survie (de 6-8 mois à 9-10 mois)(Larkin et al., 2014; Long et al., 2014), d'augmenter le taux de survie relative à 6-9 mois de 10% et de diminuer l'émergence secondaire de carcinomes. Cependant, même si cette approche combinatoire améliore globalement la survie des patients, le phénomène de résistance et de rechute survient encore trop souvent.

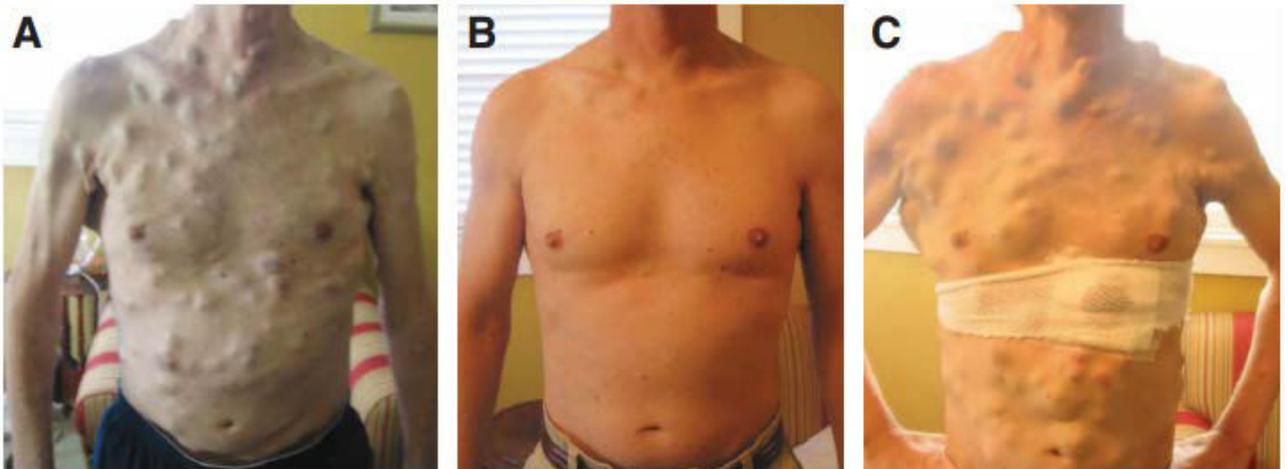


Figure 16 : Traitement d'un mélanome aux inhibiteurs de BRAF et rechute

Issue de Wagle et al, 2011

Homme de 38 ans atteint d'un mélanome métastatique muté pour BRAF. Les photos ont été prises **(A)** avant le traitement au PLX4032, **(B)** après 15 semaines de thérapie au PLX4032 et **(C)** après la rechute, au bout de 23 semaines de thérapie.

Dans le cas de mélanomes non porteurs de la mutation BRAF^{V600}, les choix thérapeutiques se limitent aux chimiothérapies associées à l'immunothérapie (Robert et al., 2011). La recherche essaye de mettre au point des thérapies ciblées contre les autres mutations fréquentes du mélanome (comme les mutations de RAS présentes dans 20% des mélanomes ou les autres mutations de RAF) mais le chemin est encore long.

5. La résistance thérapeutique

Bien que les thérapies ciblées apportent un nouvel espoir dans la lutte contre le mélanome au stade métastatique, agissant positivement sur le taux de survie des patients et ayant des effets notables, les cellules tumorales développent très rapidement et trop fréquemment des moyens de contrecarrer leurs effets. Il s'agit du phénomène de "drug-resistance", qui peut se partager en ses deux composantes intrinsèque et extrinsèque et résulte de modifications génétiques ou épigénétiques menant à la réactivation des voies des MAP kinases et/ou PI3K-AKT.

a. La résistance intrinsèque

Intrinsèquement, toute tumeur est composée d'une mosaïque de cellules hétérogènes au statut mutationnel varié. Soumises à la pression d'une molécule thérapeutique, les plus vulnérables seront supprimées tandis que celles possédant des mutations les protégeant de l'action de la drogue continueront à proliférer. Il s'agit du phénomène de sélection d'un clone résistant, le dit clone survivant au traitement étant le point de départ du développement de nouvelles métastases. Plusieurs exemples de ces mécanismes de résistance innée peuvent être rapportés.

Une étude a montré l'existence de cellules tumorales surexprimant les transporteurs ABC (ATP-Binding Cassette), ce qui permet l'efflux de nombreux composés thérapeutiques tels la Dacarbazine ou le Vemurafenib, entraînant la résistance des tumeurs auxquelles elles sont adjointes (Chartrain et al., 2012).

La perte de PTEN survient dans 10 à 35% des mélanomes, et est mutuellement exclusive des mutations NRAS tout en co-existant avec les mutations de BRAF. PTEN est perdue dans les pluparts des mélanomes par la perte de son hétérozygocie, des mutations et sa méthylation. PTEN sert de supresseur de tumeurs et de régulateur majeur de PI3K (Paraiso et al., 2011; Xing et al., 2012). La délétion ou la mutation de PTEN sont associées avec une faible survie des patients traités par des inhibiteurs de BRAF. Il est connu que la perte de PTEN seule n'est pas suffisante pour conférer la

résistance aux inhibiteurs de BRAF, d'autres altérations sont nécessaires comme l'activation d'AKT. L'inactivation de PTEN dans des cellules de mélanome diminue leur sensibilité aux inhibiteurs de BRAF (Nathanson et al., 2013). En essai clinique, les patients avec une forme sauvage de PTEN traités par inhibiteurs de BRAF présentent une meilleure survie par rapport aux patients avec une forme mutée (Shao and Aplin, 2010). Une approche par double inhibition de BRAF et PI3K a été testée, parvenant à surpasser la résistance et à restaurer l'apoptose des cellules déplétées pour PTEN (Shi et al., 2014).

Dans le cycle cellulaire, la cycline D1 régule la prolifération via sa liaison à CDK4 et CDK6, qui activent la protéine Rb et mène à la progression du cycle cellulaire. Les mutations de CDK4 et l'amplification de la cycline D1 confère une forte résistance aux thérapies par inhibiteurs de BRAF (Smalley et al., 2008). L'amplification de la cycline D1 est retrouvée dans environ 20% des mélanomes mutés pour BRAF. Les inhibiteurs de CDK4 et CDK6 échouent également à diminuer la taille des tumeurs, mais lorsque combinés avec des inhibiteurs de BRAF et de MEK une réponse de 30% est observée dans les modèles murins (Flaherty et al., 2012).

Les cellules stromales sécrètent plusieurs facteurs comme le HGF, capable d'activer la croissance des cellules tumorales par effet paracrine en augmentant la PI3K, conférant une résistance aux inhibiteurs de BRAF et à la combinaison d'inhibiteurs contre BRAF et MEK (Straussman et al., 2012). Il a été rapporté qu'en lignées cellulaires la combinaison d'inhibiteurs de BRAF et d'AKT ou des thérapies anti-transition mésoenchymo-épithéliale pouvait permettre de surpasser la résistance induite par cette voie (Wilson et al., 2012).

NF1 est un suppresseur de tumeurs de RAS, les mutations de NF1 sont présentes dans 14% des mélanomes. L'inactivation de NF1 mène à l'activation des voies RAS, PI3K/AKT/mTOR et MAPK. Les mutations de NF1 préviennent la sénescence des mélanomes lors de l'inhibition de BRAF. De plus, elles co-existent avec les mutations de NRAS dans l'inactivation de BRAF. Dans ce scénario, un moyen de surpasser la résistance à l'inhibition de BRAF est la combinaison d'inhibiteurs de MEK et de mTOR (Gibney and Smalley, 2013).

b. La résistance acquise

Les mécanismes de résistance acquise sont associés principalement avec la réactivation de la voie des MAP kinases (>70%), parfois en parallèle de la réactivation de la voie PI3K/AKT, et dans un

plus petits nombres de patients celà dépend exclusivement de la réactivation d'AKT (PI3K/PTEN/mTOR).

Les inhibiteurs de BRAF induisent la suppression de la signalisation MEK/ERK, mais activent cette signalisation dans les cellules mutées pour NRAS. En présence de l'oncogène RAS, les inhibiteurs de BRAF mènent à la formation d'hétéro- ou homodimères CRAF/BRAF. Une partie des inhibiteurs de BRAF se lie à ces dimères et une autre partie reste libre. Les inhibiteurs liés activent les libres, à via des changements de conformation activent CRAF, aboutissant à l'activation de la voie MEK/ERK (Poulikakos et al., 2011).

Les mutations de NRAS en conjonction de NF1 induit l'activation des MAPK dans 30% des mélanomes. Les mutations de BRAF et NRAS sont considérés comme étant mutuellement exclusives. Comme vu précédemment, les mutations de NRAS activent la voie des MAPK via les dimères CRAF/BRAF en présence d'inhibiteurs de BRAF (Heidorn et al., 2010). En essais cliniques, l'inhibiteur de MEK binimetinib atteint 20% de réponse dans les mélanomes mutés NRAS (Ascierto et al., 2013).

La surexpression ou l'hyper-activation des RTKs peut mener à la résistance via des voies de signalisation parallèles ou par l'induction directe de la voie RAS (Deng et al., 2012). Les récepteurs les plus fréquemment impliqués sont le PDGFR β et l'IGF-1R (Gopal et al., 2010; Shi et al., 2011). L'activation de ces récepteurs est due à des changements épigénétiques. L'activation des RTKs induit l'activation de la voie PI3K dans les patients traités par inhibiteurs de BRAF ou de MEK, menant à leur résistance (Goel et al., 2006). Le gène de l'EGFR n'est pas normalement exprimé dans les mélanomes non-traités, mais certains patients qui développent des résistances aux inhibiteurs de BRAF ou de MEK le surexprime. Dans ce cas, l'inhibition de l'EGFR restaure la sensibilité aux traitements (Sun et al., 2014).

La voie des MAP kinases est dérégulée dans plus de 70% des mélanomes, et la voie PI3K/AKT/mTOR est dérégulée dans plus de 50% des mélanomes. Il a été montré qu'une perte de PTEN ou des mutations de PI3K ou AKT sont retrouvées dans 10 à 20% des cas qui développent une résistance précoce, ou qui sont intrinsèquement résistants à l'inhibition des MAPK. Des expériences sur lignées de mélanome renforcent l'idée de l'utilisation de traitement combinés de BRAF/MEK avec des inhibiteurs de PI3K/AKT pour contrer la résistance (Chandarlapaty et al., 2011; Rodrik-Outmezguine et al., 2011).

II. La transition épithélio-mésenchymateuse (EMT)

Etape clef dans l'acquisition des capacités invasives indispensables à la formation de métastases, la transition de type épithélio-mésenchymateuse des mélanomes leur permet de quitter le phénotype mélanocytaire, semblable à des cellules épithéliales, vers un phénotype proche des cellules mésenchymateuses.

A. L'EMT dans le développement embryonnaire et les pathologies

Un épithélium est une couche ou une multicouche de cellules avec des fonctions variables. Les cellules épithéliales présentent une polarité apico-basale, adhèrent et communiquent entre elles via des jonctions intercellulaires spécialisées. Elles sont positionnées à la membrane plasmique qui participe à leur physiologie (par exemple via leur interaction avec les intégrines). Ainsi, les épithéliums constituent des barrières perméables qui délimitent tissus et organes (Huang et al., 2012a). La transition des cellules épithéliales en cellules mésenchymateuses, au cours du développement ou pathologiquement, suit un programme commun. Cependant, ce programme montre une grande flexibilité et quelques variations, qui dépendent du type cellulaire, du contexte tissulaire et des signaux qui activent le programme d'EMT. En effet, l'EMT a été subdivisée en trois types distincts, qui sont dépendants du contexte physiologique (Kalluri and Weinberg, 2009). De plus, la plasticité du phénotype épithélial permet aux cellules d'alterner plusieurs fois entre la transition épithélio-mésenchymateuse et son inverse, la transition mésenchymo-épithéliale.

Quelque soit le tissu concerné, les événements clefs de l'EMT sont : la dissolution des jonctions cellule-cellule; la perte de la polarité apico-basale et l'acquisition d'une polarité antéro-postérieure; la réorganisation du cytosquelette et le changement de morphologie; l'extinction des gènes exprimant la signature épithéliale et l'activation de ceux participant au phénotype mésenchymateux; l'augmentation des protrusions et de la motilité; l'acquisition de propriétés invasives, notamment la dégradation de la matrice extracellulaire.

De plus, les cellules subissant l'EMT acquièrent également une résistance à la sénescence, l'apoptose et aux thérapies (Nieto et al., 2016; Thiery et al., 2009). Similairement aux cellules épithéliales, les cellules endothéliales peuvent faire une transition vers un phénotype mésenchymateux.

B. Les grandes étapes de l'EMT

1. Déconstruction des jonctions cellulaires et de la polarité

Figure 17 : Les événements cellulaires au cours de l'EMT

Les complexes protéiques de surfaces spécialisés dans la jonction cellule-cellule sont essentiels à l'intégrité épithéliale. Les contacts cellulaires sont assurés sur leurs surfaces latérales par les jonctions serrées, les jonctions adhérentes, les jonctions lacunaires et les desmosomes. Lors de l'initiation de l'EMT, ces jonctions sont dissoutes et les protéines qu'elles contenaient sont relocalisées et/ou dégradées. La dissolution des jonctions serrées au cours de l'EMT s'accompagne de la diminution de l'expression des claudines et de l'occludine, ainsi que la diffusion de ZO-1 hors des contacts cellule-cellule (Huang et al., 2012a). Au cours de la déstabilisation des jonction adhérentes, la cadhérine E (E pour épithéliale) est clivée à la membrane plasmique puis dégradée (Yilmaz and Christofori, 2009). En conséquence, la β -caténine ne peut plus interagir avec la cadhérine E, et elle est soit dégradée, soit protégée de la dégradation (par exemple en réponse à la voie WNT) pour resservir dans le processus de transcription (Niehrs, 2012). La caténine p120 s'accumule aussi dans le noyau et participe à la transcription suite à la diminution des niveaux de cadhérine E (Kourtidis et al., 2013). L'initiation de l'EMT affecte aussi les desmosomes (Huang et al., 2012a) (Yilmaz and Christofori, 2009), et l'intégrité des jonctions lacunaires est compromises par la diminution de la connexine (Bax et al., 2011). Avec la progression de l'EMT, l'expression des protéines de jonctions est transcriptionnellement réprimée, stabilisant la perte des jonctions épithéliales (De Craene and Berx, 2013; Peinado et al., 2007).

Les cellules épithéliales maintiennent leur polarité apico-basale via leur interaction avec la lame basale, cette polarité étant organisée par des complexes protéiques qui s'intègrent physiquement et fonctionnellement aux jonctions cellulaires. Les complexes PAR (comprenant PAR6, PAR3 et aPKC) et Crumbs (composés de CRB, PALS1 et PATJ) localisent à l'apex cellulaire en association des jonctions serrées, définissant le compartiment apical. Le complexe Scribble (SCRIB, DLG et LGL) définit le compartiment basocellulaire (St Johnston and Ahringer, 2010). En conséquence, la dissolution des jonctions épithéliales durant l'EMT confère la perte de la polarité apico-basale (Huang et al., 2012a). Supportant cette association, la diminution d'expression de la cadhérine E dans les cellules tumorales prévient l'interaction de SCRIB avec la membrane plasmique latérale (Navarro et al., 2005); et l'extinction de SCRIB, ou de la cadhérine E, réduit l'adhésion et augmente la motilité (Qin et al., 2005). Une fois l'EMT initiée, l'expression des protéines des complexes de polarité comme CRB3 et LGL2 est réduite (Moreno-Bueno et al., 2008), déstabilisant plus avant le phénotype polarisé.

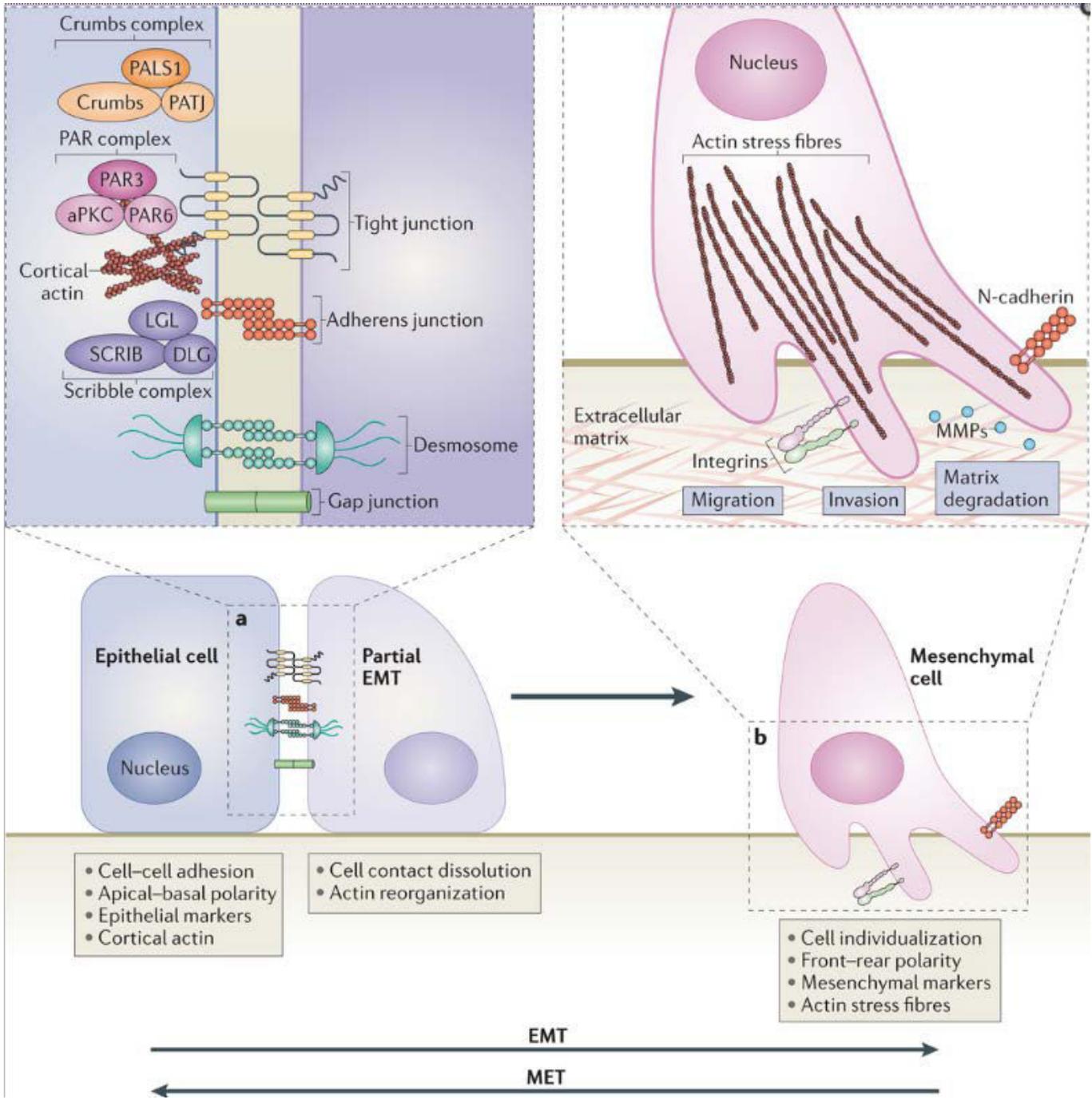


Figure 17 : Les événements cellulaires au cours de l'EMT

Issue de Lamouille et al., 2014

2. La modification du cytosquelette et la motilité

Les cellules effectuant l'EMT réorganisent leur cytosquelette d'actine corticale en une forme qui permet des élongations dynamiques et la motilité (Thiery and Sleeman, 2006; Yilmaz and Christofori, 2009, 2010). Ces nouvelles projections membranaires riches en actine facilitent les mouvements cellulaires et servent d'extensions sensibles au cytosquelette. Ces projections incluent des protrusions membranaires en feuillet (nommées lamellipodes), et des extensions en pointe (nommées filopodes) à l'extrémité des lamellipodes (Ridley, 2011). Les invadopodes effectuent une dégradation protéolytique de la matrice extracellulaire, facilitant l'invasion cellulaire (McNiven, 2013; Ridley, 2011). Finalement, l'EMT est caractérisée par l'augmentation de la contractilité des cellules et la formation de fibres de stress. Ces changements dynamiques de l'organisation de l'actine sont probablement médiés par des protéines de régulation telle que la moésine (Haynes et al., 2011), mais le mécanisme moléculaire contrôlant la dynamique de l'actine filamenteuse durant l'EMT reste à être élucidé.

Les GTPases de la famille Rho régulent la dynamique de l'actine et contrôlent son réarrangement durant l'EMT. Parmi elles, RhoA induit la formation de fibres de stress, pendant que RAC1 et CDC42 contrôlent la formation des lamellipodes et des filopodes. L'activation des GTPases Rho est étroitement régulée par les GEFs, les GAPs et les GDIs (Ridley, 2011; Yilmaz and Christofori, 2009). Suivant l'activation de Rho par l'EMT, ROCK coopère avec DIA1 pour induire la polymérisation de l'actine. ROCK induit aussi la phosphorylation de la chaîne légère de la myosine, ce qui renforce la contractilité de l'acto-myosine et active LIMK pour inactiver la cofiline, un facteur de dissociation de l'actine (Narumiya et al., 2009). Après l'activation de RAC2 ou CDC42, la kinase PAK1 active ses cibles, qui sont impliquées dans l'étalement cellulaire et la motilité (Whale et al., 2011). Les GTPases Rho régulent également la formation des complexes de jonctions cellule-cellule et la stabilité des jonctions adhérentes. La caténine p120 cytoplasmique, qui est générée au cours de l'EMT, réprime l'activité de Rho. Ceci peut faciliter la dissociation des jonctions cellulaires et activer RAC et CDC42 pour induire la formation des protrusions membranaires et la motilité cellulaire (Anastasiadis and Reynolds, 2001).

La conversion de la polarité apico-basale à antéro-postérieure implique un dialogue entre les GTPases Rho et les protéines définissant la polarité apico-basale (Godde et al., 2010; Nelson, 2009). Pour accéder à la polarité directionnelle, les complexes PAR et Scribble, en partenariat avec les complexes PATJ et Crumbs, relocalisent au front de migration de la cellule, où RAC1 et CDC42 activent la polymérisation de l'actine et la formation des protrusions membranaires. Par contraste,

RhoA localise à l'arrière de la cellule et induit le désassemblage des complexes d'adhésion et la rétractation cellulaire (Nelson, 2009). PI3K joue un rôle central dans l'initiation de la polarité antéro-postérieure, et participe au recrutement de CDC42 et des GEFs au front (Nelson, 2009). La polarité antéro-postérieure est maintenue via une boucle de mécanismes impliquant les protéines de polarité et les petites GTPases. Par exemple, l'activation de RAC1 au front stimule PI3K, qui recrute les GEFs. Les GTPases Rho contrôlent aussi la réorganisation du cytosquelette de microtubules. Ainsi, RAC1 favorise la polymérisation des microtubules et est elle-même activée par eux au front cellulaire, constituant une boucle de rétrocontrôle positive qui participe à la réorganisation du cytosquelette de microtubules (Wittmann et al., 2003). De plus, RAC1 induit l'agrégation des intégrines vers le front cellulaire, où la localisation de PAR3 et aPKC nécessite PATJ et PALS1 (Nelson, 2009). A l'arrière de la cellule, la signalisation de RhoA inhibe l'activation de RAC1 et prévient la formation des complexes PAR (Godde et al., 2010; Nelson, 2009). La réorganisation de l'architecture cytosquelettique et des complexes de polarité, qui induit le changement de morphologie cellulaire comme l'élongation, les protrusions membranaires et la polarité antéro-postérieure, est essentielle à l'EMT et permet la migration directionnelle.

C. Les changements d'expressions génétiques

Au cours de l'EMT, les cellules diminuent l'expression des protéines épithéliales, incluant celles qui font parties des complexes de jonctions cellule-cellule (Huang et al., 2012a; Peinado et al., 2007). Elles redirigent également leurs programmes d'expression génomique pour permettre les changements dans l'architecture du cytosquelette, favorisant l'adhésion aux cellules mésenchymateuses et altérant leur interaction avec la matrice extracellulaire (De Craene and Berx, 2013; Yilmaz and Christofori, 2009, 2010). La variation des profils d'expression génomique associés à l'EMT dépend des cellules et du type de tissus impliqué, ainsi que de l'avancée de la progression vers la différenciation mésenchymateuse.

1. La transition des cadhérines

La signature de l'EMT est l'inhibition de la cadhérine E, qui renforce la déstabilisation des jonctions adhérentes. De plus, la répression des gènes codants pour les claudines, l'occludine, la desmoplakine et la plakophiline, stabilise la dissolution des jonctions serrées apicales et des desmosomes (Huang et al., 2012a). Ces changements dans l'expression génomique préviennent la formation *de novo* de jonctions cellule-cellule épithéliales, et ont pour effet la perte de la fonction de la barrière épithéliale (Peinado et al., 2007). La répression des gènes codant les protéines de

jonctions épithéliales est accompagnée de l'activation de gènes favorisant l'adhésion mésoenchymateuse. Spécifiquement, la diminution de la cadhérine E est balancée par l'augmentation de l'expression de la cadhérine N, effectuant la transition de cadhérines qui altère l'adhésion cellulaire (Wheelock et al., 2008; Yilmaz and Christofori, 2009). Via cette transition, les cellules perdent leur association à l'épithélium et acquièrent une affinité pour les cellules mésoenchymateuses, par interaction homotypique entre cadhérines N. Ces interactions sont plus faibles que l'interaction homotypique des cadhérines E, facilitant ainsi la migration cellulaire et l'invasion (Theveneau and Mayor, 2012). La cadhérine N se connecte au cytosquelette par les caténines α et β , et interagit aussi avec la caténine p120, aux médiateurs de signalisation (Brieher and Yap, 2013) et aux RTKs, comme le PDGFR et FGFR (Hansen et al., 2008). L'EMT active aussi l'expression des NCAM (neural cell adhesion molecule), un autre partenaire de la cadhérine N dans la modulation des RTKs associés (Cavallaro and Christofori, 2004). NCAM interagit avec la tyrosine kinase FYN de la famille Src, facilitant l'assemblage des adhésions focales, de la migration et de l'invasion (Lehembre et al., 2008).

2. Remodelage du cytosquelette

L'altération des gènes contrôlant le cytosquelette et les protéines des complexes de polarité contribue aussi à l'EMT. La composition des filaments intermédiaires change avec la répression de la cytokératine et l'activation de l'expression de la vimentine (Huang et al., 2012a). Les filaments de kératine et de vimentines régulent le trafic des organelles et des protéines associées à la membrane, mais ils ciblent des protéines différentes dans leur transport à la membrane. Par exemple, la kératine, mais pas la vimentine, peut transporter la cadhérine E à la membrane (Toivola et al., 2005). Les changements dans la composition des filaments intermédiaires permettent aussi la motilité cellulaire, possiblement par l'association de la vimentine aux protéines motrices (Mendez et al., 2010). Pour induire la motilité directionnelle, les cellules subissant l'EMT répriment l'expression des complexes Crumbs apicaux, notamment les protéines Crumbs3 et PATJ, et des complexes basolatéraux Scribble, dont la protéine LGL2 (Moreno-Bueno et al., 2008; Nelson, 2009; Yilmaz and Christofori, 2009).

3. Evolution du rapport à la matrice extracellulaire

Le remodelage de la matrice extracellulaire et les changements d'interactions entre les cellules et la matrice sont essentiels dans l'initiation et la progression de l'EMT. Les complexes intégrines permettent aux cellules de sentir les signaux des protéines matricielles via l'interaction avec les

médiateurs de signalisation, comme ILK (integrin-linked kinase), PINCH (Cys-His protein 1) et la parvine (Hansen et al., 2008; Yilmaz and Christofori, 2009). Lorsque les cellules épithéliales se différencient en cellules mésenchymateuse, elles n'interagissent plus avec la lame basale et communiquent avec une matrice extracellulaire différente. Ainsi, les cellules répriment les intégrines épithéliales mais en activent d'autres, certaines de ces nouvelles intégrines ayant un rôle clef dans l'EMT (Yilmaz and Christofori, 2009). Par exemple, au cours de l'EMT l'expression de l'intégrine épithéliale $\alpha 6 \beta 4$, qui interagit avec la lame basale, est inhibée par l'extinction épigénétique du gène de l'intégrine $\beta 4$ (Yang et al., 2009). De plus, l'intégrine épithéliale $\alpha 3 \beta 1$, qui se lie à la laminine mais qui est aussi associée à la cadhérine E, est requise pour la progression de l'EMT et intègre les signaux de la β caténine et de la voie TGF β -SMAD (Kim et al., 2009). L'augmentation de l'intégrine $\alpha 5 \beta 1$ au cours de l'EMT favorise l'adhésion cellulaire à la fibronectine, dont l'expression est aussi activée par l'EMT et stimule la migration (Maschler et al., 2005; Mise et al., 2012). L'augmentation d'expression des intégrines $\alpha 1 \beta 1$ et $\alpha 2 \beta 1$ et leur interaction avec le collagène de type 1 facilitent la disruption des complexes de cadhérine E et la translocation de la β caténine au noyau (Koenig et al., 2006).

L'évolution du répertoire des intégrines durant l'EMT est corrélée à l'augmentation d'expression des protéases, comme les MMP2 et MMP9, renforçant la dégradation de la matrice et l'invasion (Nistico et al., 2012). Les MMPs ciblent également les protéines transmembranaires, ce qui, par exemple, résulte à la libération du domaine extracellulaire de la cadhérine E, contribuant à la perte des jonctions adhérentes (Nistico et al., 2012). De plus, la MMP3 peut induire l'EMT via l'augmentation de l'expression et de l'activité de RAC1B, qui provoque l'augmentation des ROS intracellulaires menant à l'augmentation de l'expression de SNAIL1 (Radisky et al., 2005). L'augmentation de l'intégrine $\alpha \nu \beta 6$ pendant l'EMT est corrélée avec l'augmentation d'expression des protéases, l'intégrine et les protéases colocalisent au niveau des invadopodes qui sont impliqués dans l'invasion cellulaire (McNiven, 2013; Yilmaz and Christofori, 2009). Aussi, l'intégrine $\alpha \nu \beta 3$ est augmentée avec l'EMT, ce qui contribue aux fonctions pro-invasives du front cellulaire des cellules cancéreuses (Shah et al., 2012). Enfin, la dégradation localisée de la matrice par les cellules invasives peut libérer les facteurs de croissances stockés, et agir sur les cellules de manière autocrine. Certaines protéases, qui affectent l'invasion et les intégrines comme l' $\alpha \nu \beta 6$, activent le TGF β stocké sous forme latente au cours de l'EMT (Sheppard, 2005). Ceci expose les cellules à une augmentation de la signalisation du TGF β , qui renforce l'EMT et stimule l'expression de protéines matricielles comme le collagène et la fibronectine, favorisant le remodelage de la matrice pour en changer la composition et les propriétés (Thiery et al., 2009; Thiery and Sleeman, 2006).

D. Les voies de contrôles de l'EMT

1. Les facteurs de transcriptions contrôlant l'EMT

Les changements d'expression génomique qui contribuent à la répression du phénotype épithéliale et à l'activation du phénotype mésenchymateux impliquent des facteurs de transcriptions clefs, comme SNAIL, TWIST et ZEB. Leur expression est activée précocement dans l'EMT, et joue un rôle central dans le développement, la fibrose et le cancer. Ces facteurs de transcription ayant des profils d'expression distincts, leur contribution à l'EMT dépend des types de cellules et de tissus impliqués, et de la signalisation ayant initié l'EMT. Ils contrôlent souvent l'un l'autre leur expression et coopèrent fonctionnellement au niveau des gènes cibles (Peinado et al., 2007). De plus l'ajout d'autres facteurs de transcription pousse plus avant le programme transcriptionnel de l'EMT et en favorise la progression. Ensemble, les facteurs de transcription de l'EMT coordonnent la répression des gènes épithéliaux et induisent les gènes mésenchymateux, les même facteurs participant souvent à la fois aux mécanismes de répression et d'activation (De Craene and Berx, 2013).

Figure 18 : Les facteurs de transcriptions de l'EMT

Facteurs de transcription	Cibles inhibées durant l'EMT	Cibles activées durant l'EMT	Voies de signalisations qui les induisent	Références
SNAIL et SLUG	Cadhérine E, Claudines, Occludine, Crumbs3, PALS1, PATJ, Cytokératines, Desmoplakine, Plakophiline	Fibronectine, Cadhérine N, Collagène, MMP15, MMP2, MMP9, TWIST, ID1, ID2, ZEB1, ZEB2	TGFβ-SMAD3, WNT-β-Caténine, Notch, PI3K-AKT, NFκB, EGF, FGF	(Julien et al., 2007; Kim et al., 2007; Peinado et al., 2007; Sahlgren et al., 2008; Wang et al., 2009; Wu et al., 2009a; Xu et al., 2009; Yook et al., 2006)
TWIST1	Cadhérine E, Claudines, Occludine, Desmoplakine, plakoglobine	Fibronectine, Cadhérine N, Intégrine α5	MAPK	(Hong et al., 2011; Peinado et al., 2007; Xu et al., 2009; Yang et al., 2010; Yang et al., 2008)
ZEB1 et ZEB2	Cadhérine E, ZO1, Crumbs3, Plakophiline	Cadhérines N, MMPs	TGFβ-SMAD3, WNT-β-Caténine, RAS-MAPK	(Nishimura et al., 2006; Peinado et al., 2007; Postigo, 2003; Postigo et al., 2003; Sanchez-Tillo et al., 2010; Shirakihara et al., 2007; Wang et al.,

				2007; Xu et al., 2009)
FOXD3	Inconnues	Inconnues	Intégrine β 1, Laminine	(Cheung et al., 2005)
FOXC2	Cadhérine E	Fibronectine, Vimentine, Cadhérine N, α -SMA	TGF β -SMAD3	(Mani et al., 2007)
FOXF1	Cadhérine E, Claudine 1, Occludines, Desmogléines (1 β et 2), Desmocolline2, Desmoplakine	Fibronectine, Cadhérine N	Inconnues	(Nilsson et al., 2010)
FOXQ1	Cadhérine E	Fibronectine, Cadhérine N, Vimentine	Inconnues	(Qiao et al., 2011)
FOXO3A	Cadhérine E	SNAIL	AKT	(Belguise et al., 2007)
FOXA1	Cadhérine E	Fibronectine, Vimentine, SNAIL	TGF β , HGF, AKT	(Song et al., 2010)
FOXA2	Cadhérine E, ZO1	Fibronectine, Vimentine, Cadhérine N, SNAIL, SLUG	TGF β , HGF, AKT	(Song et al., 2010)
Serpent, GATA4 et GATA6	Cadhérine E, Crumbs, Claudines	Cadhérine N, MMP1	Inconnues	(Campbell et al., 2011)
HMG2	Cadhérine E	SNAIL, SLUG, TWIST	TGF β -SMAD3	(Thuault et al., 2008)
SOX9	Inconnues	SLUG	BMPs, PKA	(Sakai et al., 2006)
KLF8	Cadhérine E	MMP9	Inconnues	(McDonald et al., 2011)
CBFA-KAP1	Inconnues	FSP1	Inconnues	(Venkov et al., 2007)
ZNF703	Cadhérine E	Vimentine, Cadhérine N, SNAIL, Cytokératine	GTPases Rho	(Slorach et al., 2011)
PRX1	Cadhérine E	Vimentine, Laminine	BMP2, TGF β	(Ocana et al., 2012)

a. Les facteurs de transcription SNAIL et SLUG

Figure 19 : Rôles et régulations des facteurs de transcriptions majeurs de l'EMT

Parmi les trois protéines SNAIL, SNAIL1 (aussi nommée simplement SNAIL) et SNAIL2 (SLUG) activent le programme d'EMT au cours du développement, de la fibrose et du cancer (Barralho-Gimeno and Nieto, 2005). Ils répriment les gènes épithéliaux en se liant à la boîte E des séquences d'ADN via leurs domaines à doigts de zinc c-terminaux (Peinado et al., 2007; Xu et al., 2009). La façon dont SNAIL réprime l'expression de ses gènes cibles est bien illustrée par l'activité de SNAIL1 sur le promoteur de la cadhérine E (Batlle et al., 2000; Dong et al., 2013). Lors de la liaison à la boîte E dans la région proximale du promoteur du gène de la cadhérine E, SNAIL1 recrute le complexe PRC2 (Polycomb repressive complex 2), qui contient la méthyltransférase EZH2 (enhancer of zeste

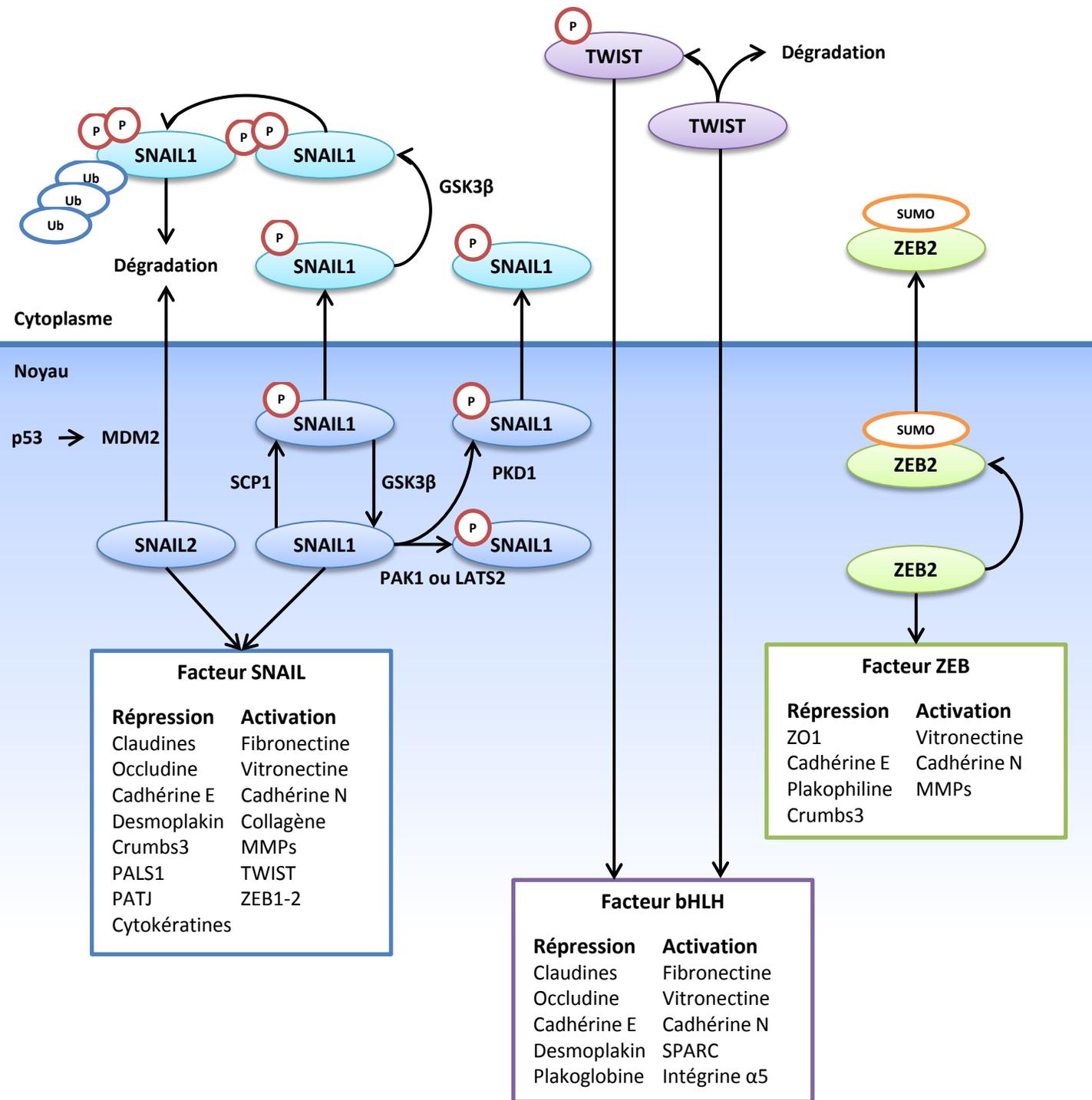


Figure 19 : Rôles et régulations des facteurs de transcriptions majeurs de l'EMT
 Adaptée de Lamouille et al., 2014

homologue 2), G9a, SUV39H1 (suppressor of variegation 3-9 homologue 1), le co-répresseur SIN3A, les désacétylases d'histone 1, 2 et 3, et LSD1 (Lys-specific demethylase 1). Tous ces composants coordonnent la modification des histones, spécifiquement la méthylation et l'acétylation des histones H3K4, H3K9 et H3K27 (Dong et al., 2013; Dong et al., 2012; Herranz et al., 2008; Lin et al., 2010b; Peinado et al., 2004a; Tong et al., 2012). La méthylation de H3K9 et de H3K27 marque la chromatine réprimée, tandis que la méthylation de H3K4 et l'acétylation de H3K9 marque la chromatine active. Les marqueurs de répression et d'activation peuvent colocaliser dans les "domaines bivalents", comme pour le promoteur de la cadhérine E, mais qui survient aussi pour de nombreux promoteurs des cellules souches embryonniques (Bernstein et al., 2006). Cela crée un état d'équilibre pour le promoteur, qui permet son activation tout en maintenant la répression en l'absence des signaux de différenciation. Le contrôle bivalent du promoteur de la cadhérine E peut contribuer à la nature réversible de l'EMT. En plus de réprimer les gènes épithéliaux, SNAIL1 active les gènes contribuant au phénotype mésenchymateux. Ceci peut aussi impliquer des domaines bivalents, avec par exemple la triméthylation inhibitrice de H3K9 et l'acétylation activatrice de H3K18, qui permettent l'expression mésodermique goosecoïde en réponse au TGF β nodal (Xi et al., 2011). De nombreuses voies de signalisation coopèrent dans l'initiation et la progression de l'EMT, et elles activent souvent l'expression de SNAIL1. Le TGF β et les protéines de la famille WNT, Notch et les facteurs de croissance agissent via les RTKs, tous activant l'expression de SNAIL1 selon le contexte physiologique (Peinado et al., 2007). SNAIL et SLUG coopèrent avec d'autres régulateurs de la transcription pour contrôler l'expression génomique. Par exemple, SNAIL coopère avec ETS1 lors de son activation par les MAPK, pour activer l'expression des MMPs (Jorda et al., 2005). Il coopère aussi avec le complexe SMAD3-SMAD4 pour induire via le TGF β la répression de la cadhérine E et de l'occludine (Vincent et al., 2009).

Les modifications post-traductionnelles qui initient les voies de signalisation contrôlent aussi la localisation et la dégradation de SNAIL1, et de fait son activité (Peinado et al., 2007). SNAIL1 est phosphorylé par GSK3 β sur deux motifs riches en sérines permettant l'activation de son activité transcriptionnelle. La phosphorylation des sérines 97 et 101 du premier motif facilite l'export du noyau de SNAIL1, et la phosphorylation des sérines 108, 112, 116 et 120 du second motif induit sa dégradation après ubiquitination (Zhou et al., 2004). Plusieurs voies de signalisation augmentent l'activité de SNAIL1 en influençant la phosphorylation de GSK3 β . Les voies WNT et PI3K-AKT inhibent la phosphorylation de SNAIL1 par GSK3 β (Yook et al., 2006), tandis que les voies de Notch et NF- κ B interfèrent avec l'interaction GSK3 β -SNAIL1 (Sahlgren et al., 2008; Wu et al., 2009a), ces deux mécanismes favorisant la stabilité de SNAIL1. Inversement, SCP1 (small C-terminal domain phosphatase 1) agit comme antagoniste de la phosphorylation par GSK3 β et retient SNAIL1 au noyau

où il réprime la transcription (Wu et al., 2009b). De plus, PKD1 phosphoryle SNAIL1 sur sa sérine 11 pour faciliter l'export du noyau (Du et al., 2010), alors que sa phosphorylation par PAK1 sur la sérine 246 ou par LATS2 sur sa thréonine 203 augmente la rétention nucléaire et favorise l'EMT (Yang et al., 2005; Zhang et al., 2012c). Le suppresseur de tumeur p53 recrute SNAIL2 pour induire sa dégradation après interaction avec l'ubiquitine ligase MDM2, qui en conséquence inhibe l'invasion tumorale (Wang et al., 2009).

b. Les facteurs de transcription bHLH

Les facteurs bHLH (homodimeric and heterodimeric basic helix-loop-helix) sont des régulateurs clefs de la spécification des lignages cellulaires et de la différenciation. Parmi eux, les protéines E12, E47, TWIST1, TWIST2 et ID (inhibitor of differentiation) jouent des rôles fondamentaux pour la progression de l'EMT (De Craene and Berx, 2013; Peinado et al., 2007). Comme pour SNAIL, l'expression de TWIST est diminuée par les gènes épithéliaux et activée en réponses à l'expression des gènes mésenchymateux (Xu et al., 2009). Dans les cellules cancéreuses, TWIST1 réprime la cadhérine E et induit l'expression de la cadhérine N indépendamment de SNAIL et probablement via l'association d'autres protéines (Xu et al., 2009; Yang et al., 2012; Yang et al., 2010; Yang et al., 2008). TWIST recrute la méthyltransférase SET8, qui induit la monométhylation de l'histone H4K20, un marqueur associé à la répression du promoteur de la cadhérine E et à l'activation de la cadhérine N (Yang et al., 2012). Dans les cancers de la tête et du cou, TWIST1 active l'expression de BMI1, un composant du complexe PRC1, qui coopère à la boîte E des promoteurs réprimant la cadhérine E et l'inhibiteur de cycle p16 (codé par le gène *CDKN2A*) (Yang et al., 2010). Cette coopération implique le recrutement du complexe PRC2, qui triméthyle l'histone H3K27 affectant lui aussi les promoteurs de la cadhérine E et de *CDKN2A* (Yang et al., 2010).

Diverses voies de signalisation activent l'expression de TWIST au cours du développement et de la tumorigénèse (Peinado et al., 2007; Xu et al., 2009). Notamment, le facteur de transcription HIF1 α (hypoxia-inducible factor 1 α) induit TWIST en condition hypoxique, ce qui favorise l'EMT et la dissémination métastatique (Yang et al., 2008). De plus, le stress mécanique induit l'expression de twist dans l'épithélium chez *Drosophila melanogaster*, et cela d'une manière indépendante de la β caténine (Farge, 2003). L'activité de TWIST dépend grandement de sa composition dimérique. TWIST1 et TWIST2 forment des homodimères ou des hétérodimères avec E12 ou E47, permettant la régulation de la boîte E de liaison à l'ADN et contrôlant ainsi la transcription. Les protéines ID ne peuvent pas se lier à l'ADN mais s'associent avec TWIST, E12 ou E47 pour inhiber fonctionnellement TWIST. En conséquence, la répression du gène d'ID par le TGF β induit la levée de l'inhibition de

TWIST (ou des autres facteurs bHLH) et augmente son activité, favorisant l'EMT (Kang et al., 2003). Comme avec SNAIL, la stabilité de TWIST1 est régulée par sa phosphorylation sur la sérine 68 par les MAPKs, le protégeant de la dégradation par le système ubiquitine-protéasome et augmentant son activité (Hong et al., 2011).

c. Les facteurs de transcription ZEB

Les deux facteurs de transcription ZEB1 et ZEB2 agissent comme des régulateurs génétiques en se liant aux boîtes E de l'ADN et ainsi réprimer ou activer la transcription (Peinado et al., 2007; Xu et al., 2009). La répression transcriptionnelle de ZEB implique souvent le recrutement du corépresseur CTBP (C-terminal-binding protein). Cependant, dans certains cancers, ZEB1 réprime l'expression de la cadhérine E, indépendamment de CTBP, en recrutant la protéine BRG1 de type SWI/SNF (Switch/sucrose nonfermentable) (Sanchez-Tillo et al., 2010). ZEB1 peut aussi interagir avec les coactivateurs de transcription PCAF (p300/CBP-associated factor) et p300, faisant passer ZEB1 de répresseur de transcription à un activateur (Postigo et al., 2003). De plus, ZEB1 peut recruter LSD1 (Lys-specific demethylase 1), probablement le reliant à la déméthylation des histones dans l'EMT (Wang et al., 2007). Par conséquent, comme SNAIL et TWIST, ZEB1 et ZEB2 peuvent se lier aux boîtes E de l'ADN pour réprimer ou activer la transcription, participant ainsi à la répression des gènes des jonctions épithéliales et de la polarité pour ensuite activer les gènes mésenchymateux définissant le phénotype de l'EMT (Peinado et al., 2007; Xu et al., 2009).

L'expression de ZEB suit souvent l'activation de l'expression de SNAIL, ce qui est cohérent par le ciblage du gène *ZEB1* par SNAIL1. De plus, TWIST1 coopère avec SNAIL1 dans l'induction de ZEB1 (Dave et al., 2011). L'expression de ZEB est induite en réponse aux voies du TGF β et de WNT, ainsi que par les facteurs de croissance activant la signalisation RAS-MAPK (Xu et al., 2009). L'induction de ZEB par le TGF β implique ETS1, qui est activée par les MAPK (Shirakihara et al., 2007). L'expression de ZEB peut être réprimée post-transcriptionnellement par des microARNs (Braeutigam et al., 2014; Goncalves et al., 2009; Shapiro et al., 2011; Valacca et al., 2010), ainsi que par la sumoylation post-traductionnelle de ZEB2 par PRC2 en association avec CBTP, favorisant sa localisation cytoplasmique et atténuant sa répression de la transcription (Long et al., 2005).

d. Les nouveaux facteurs de transcription régulant l'EMT

Outre les facteurs de transcription majeurs de l'EMT vus précédemment, il a été démontré que d'autres facteurs pouvaient induire ou réprimer l'EMT, aussi bien dans le développement que dans le

cancer. Plusieurs d'entre eux sont des facteurs de transcription de type FOX (forkhead box), qui sont définis par un domaine de liaison à l'ADN en "fourchette" (Eijkelenboom and Burgering, 2013). D'autres appartiennent à la famille GATA, caractérisés par des modules de liaison à l'ADN en duo de doigts de zinc, contrôlant la différenciation de divers lignages cellulaires (Bresnick et al., 2010). Ils sont requis dans l'EMT pour réguler les gènes des jonctions épithéliales et les complexes de polarité (Campbell et al., 2011). Le facteur SOX (SRY box) affecte aussi l'EMT en synergisant avec SNAIL1 et SNAIL2 dans l'induction de l'EMT et l'invasion cellulaire (Guo et al., 2012; Kondoh and Kamachi, 2010; Sakai et al., 2006).

La régulation de ces facteurs de transcription, leur rôle dans l'EMT et leur relation avec SNAIL, TWIST et ZEB, ne sont pas encore bien compris. Cependant, il est clair qu'ils sont à même de coordonner l'EMT, et que certains d'entre eux sont des régulateurs clefs alors que d'autres ont probablement des fonctions plus restreintes, dépendantes du contexte tissulaire.

2. La famille TGF β , inductrice de l'EMT

La famille protéique du TGF β comprend trois membres TGF β , deux activines, plusieurs BMPs (bone morphogenic proteins) et d'autres homo- et hétérodimères de ligands, qui agissent tous par combinaison binaire de récepteurs kinases transmembranaires (Ser/Thr/Tyr kinases).

Dans le développement, l'expression de TGF β 1 et TGF β 2 est associée à des événements de type EMT comme dans la formation des coussins endocardiaques (Mercado-Pimentel and Runyan, 2007), alors que la TGF β 3 induit l'EMT responsable de la fusion du palais (Nawshad et al., 2004).

Après la naissance, le TGF β 1 enclenche l'EMT dans la guérison des blessures, la fibrose et le cancer. Par exemple, l'augmentation du TGF β 1 a été reliée à l'EMT dans les cellules mésangiales avant la fibrose du rein (Schnaper et al., 2003); dans les cellules épithéliales biliaires avant la progression d'un foie malade en fibrose hépatique (Gressner et al., 2002); et dans les fibroblastes de patients atteints de fibrose pulmonaire (Willis and Borok, 2007). Les cellules de la fibrose cardiaque subissent une transition endothelio-mésenchymateuse, également provoquée par la signalisation du TGF β (Zeisberg et al., 2007). Dans les carcinomes, l'expression et l'activité du TGF β 1 sont augmentées et favorisent une réponse épithéliale plastique, qui peut devenir une EMT, un pré requis de l'invasion tumorale et de la dissémination (Kalluri and Weinberg, 2009; Katsuno et al., 2013; Thiery et al., 2009). Par exemple, les carcinomes squameux évoluent en carcinomes invasifs à cellules fusiformes en réponse à l'augmentation d'expression de TGF β 1 activé (Portella et al., 1998).

Les autres protéines de la famille TGF β régulent également l'EMT, tout d'abord au cours du développement. VG1 (Nodal and vegetal 1) participe à l'EMT durant l'ingression cellulaire formant le

mésoderme dans les embryons de souris et de xénope (Acloque et al., 2009). La signalisation BMP coopère avec WNT et le FGF pour induire la délamination de la crête neurale (Sauka-Spengler and Bronner-Fraser, 2008), et participe également à l'EMT requise dans la formation des coussins cardiaques (Kruithof et al., 2012).

Dans des contextes pathologiques, la signalisation BMP est impliquée à la fois dans l'EMT et dans la transition mésenchimo-épithéliale (MET) (Gordon et al., 2009; Zeisberg et al., 2005). BMP2, BMP4 et BMP7 favorisent l'EMT et l'invasion dans les cellules du cancer du pancréas, notamment par la perte de la cadhérine E et l'augmentation de la MMP2 (Gordon et al., 2009). Dans la fibrose rénale, BMP7 induit la MET des fibroblastes rénaux en diminuant la sécrétion de collagène I et en restaurant l'expression de la cadhérine E (Zeisberg et al., 2005). Enfin, la signalisation TGF β et BMP induit la transition endothélio-mésenchymateuse dans la fibrodysplasie ossifiante progressive, dans laquelle l'ossification hétérotopique survient en résultat des mutations activatrices du gène d'ALK2 (activin receptor-like kinase 2), une activine de la famille TGF β et récepteur pour BMP (Medici et al., 2010).

3. Les Récepteurs Tyrosines Kinases (RTKs) induisant l'EMT

En contraste de la famille TGF β , les facteurs de croissance agissant via les RTKs transmembranaires stimulent souvent la prolifération cellulaire. La liaison au ligand induit l'autophosphorylation des RTKs, permettant l'activation des voies PI3K/AKT, ERK/MAPK, p38/MAPK, JNK et SRC. Les facteurs de croissance agissant via les RTKs induisent ainsi une EMT partielle ou totale.

a. Activations des voies PI3K/AKT et ERK/MAPK par les facteurs de croissance

L'activation de l'EMT par les RTKs souligne les rôles des voies PI3K/AKT et ERK/MAPK dans le processus de transdifférenciation. La signalisation d'AKT et mTORC2 est essentielle pour l'activation de l'EMT par les RTKs (Gulhati et al., 2011; Lamouille et al., 2012). L'activation de la voie ERK/MAPK, non seulement par les facteurs de croissance mais aussi par les mutations activatrices de RAS et RAF dans les cellules cancéreuses, contribue aussi à l'EMT. Les voies RAS et RAF activent l'expression de SNAIL et/ou SLUG, induisant l'activation des GTPases Rho, favorisant ainsi la motilité cellulaire et l'invasion dans l'EMT associée au cancer (Makrodouli et al., 2011). L'activation de RPS6KA1 (90 kDa ribosomal protein S6 kinase) par la voie ERK/MAPK contribue aux propriétés invasives des cellules épithéliales et des carcinomes, induisant l'expression du facteur de transcription FRA1 (FOS-related antigen 1) (Doehn et al., 2009).

b. Le FGF dans l'EMT

Le FGF (fibroblast growth factor) induit les caractéristiques mésenchymateuses dans les cellules épithéliales. L'EMT induite par FGF1 dans les carcinomes de la vessie est accompagnée de l'expression de SLUG, de la déstabilisation des desmosomes, et de l'expression de l'intégrine $\alpha 2\beta 1$ et de MMP13 (Billottet et al., 2008; Savagner et al., 1997; Valles et al., 1996). Le FGF agit comme un inducteur de l'EMT dans le développement, par exemple au cours de la gastrulation. Les embryons murins déficitaires en FGFR1 présentent une formation aberrante du mésoderme, et maintiennent la cadhérine E et la β caténine à la surface cellulaire (Sun et al., 1999). Plus tard dans le développement, la signalisation au FGF est requise pour la migration des cellules de la crête neurale, des études dans le xénope révélant que le *fgf2* et *fgf8* étaient impliqués dans l'expression des marqueurs de la crête neurale (Sauka-Spengler and Bronner-Fraser, 2008).

c. Le HGF dans l'EMT

Le HGF (hepatocyte growth factor), qui agit via la RTK c-MET (aussi appelée HGFR), est identifié comme un facteur de dispersion cellulaire, ayant été décrit pour convertir les cellules épithéliales rénales en cellules migratrices semblables aux fibroblastes (Stoker and Perryman, 1985). Le HGF induit l'expression de SNAIL ou SLUG, en fonction du type cellulaire, pour promouvoir l'EMT (Grotegut et al., 2006; Savagner et al., 1997). L'induction de SNAIL par le HGF requiert la voie ERK/MAPK, et implique la liaison du facteur de transcription EGR1 (early growth response 1) au promoteur de SNAIL (Grotegut et al., 2006). L'HGF induit également la déstabilisation des desmosomes et la répression du gène de la desmoplakine (Savagner et al., 1997). Le récepteur c-MET est retrouvé associé à la cadhérine E (Hiscox and Jiang, 1999), mais le rôle de cette interaction dans l'EMT reste à être clarifié. Enfin, au cours du développement, le HGF participe à l'EMT dans la formation des somites et des coussins endocardiaques (Romano and Runyan, 2000).

d. L'IGF1 dans l'EMT

L'IGF1 (insulin-like growth factor 1) induit l'EMT dans certains modèles de culture cellulaire. L'activation du récepteur à l'IGF1 provoque l'EMT dans les cellules épithéliales mammaires. Elle est caractérisée par la perte de la cadhérine E et l'acquisition de la cadhérine N, de la vimentine et de la fibronectine (Kim et al., 2007). Dans ces cellules, l'augmentation d'expression de SNAIL1, en réponse à l'IGF1, est dépendante de NF- κ B (Kim et al., 2007). Cependant, dans d'autres types cellulaires, l'EMT

induite par l'IGF1 est accompagnée de l'expression de ZEB1, et elle est dépendante de l'activation de la voie ERK/MAPK (Graham et al., 2008). De même, la voie PI3K/AKT est requise pour l'induction de l'EMT par l'IGF1 (Irie et al., 2005). De manière intéressante, dans un même système cellulaire, AKT1 et AKT2 agissent différemment, avec la diminution d'AKT1 stimulant l'EMT, cette stimulation étant bloquée par la perte d'AKT2 (Irie et al., 2005). Enfin, le récepteur à l'IGF1 forme des complexes avec la cadhérine E et l'intégrine αv (Canonici et al., 2008), mais peut aussi s'associer à c-MET (Hiscox and Jiang, 1999), la disruption de ces complexes favorisant la migration cellulaire (Canonici et al., 2008).

e. L'EGF dans l'EMT

En culture cellulaire, l'EGF (epidermal growth factor) induit l'endocytose de la cadhérine E, ainsi que l'expression de SNAIL1 et TWIST, ce qui mène à la réduction des niveaux de la cadhérine E (Lo et al., 2007; Lu et al., 2003). L'EGF induit également l'EMT dans des explants épithéliaux, augmentant la motilité cellulaire et la protéolyse via les MMP2 et -9, cette action étant dépendante de la kinase ILK et de la voie ERK/MAPK (Ahmed et al., 2006). L'activation du récepteur HER2 (human EGF receptor 2) dans l'épithélium mammaire induit la formation de tumeurs avec la propriété de l'EMT à échapper à la surveillance immunitaire (Knutson et al., 2006; Moody et al., 2005). Le facteur Cripto1, apparenté à l'EGF, peut également avoir un rôle dans le développement de l'EMT. Son expression est corrélée avec la formation de la ligne primitive embryonnaire, et de la spécification du mésoderme et de l'endoderme, une diminution de son expression provoque des défauts dans la formation du mésoderme (Rangel et al., 2012). Cripto1 peut aussi avoir un rôle dans la morphogénèse de la glande mammaire (Rangel et al., 2012). Non seulement son expression est augmentée dans le développement mammaire, mais faire exprimer Cripto1 dans des cellules épithéliales mammaires en culture, ou le sur-exprimer, induit une morphologie fibroblastique, une diminution des niveaux de cadhérine E et l'augmentation de la cadhérine N, de la vimentine et l'expression de SNAIL (Strizzi et al., 2004). Une expression augmentée de Cripto1 a également été associée à l'augmentation de la mobilité, de l'invasion et de la progression tumorale (Rangel et al., 2012). Plutôt qu'agir comme un ligand, l'activité de Cripto1 dans l'EMT semble plutôt être reliée à son rôle de co-récepteur nodal et à sa fonction dans la signalisation WNT (Morkel et al., 2003; Tao et al., 2005).

f. Le PDGF dans l'EMT

Dans les cellules d'adénocarcinomes du colon, le PDGF (platelet-derived growth factor) induit la dissolution des jonctions adhérentes, la localisation nucléaire de la β caténine et la répression de

la cadhérine E (Yang et al., 2006b). L'ablation de la sous-unité α du récepteur au PDGF provoque des anomalies crano-faciales et de la valve cardiaque, dues à une migration mésenchymateuse défectueuse et à une baisse de l'activité de la MMP2 (Robbins et al., 1999). Le VEGF (vascular endothelial growth factor), apparenté au PDGF, est un inducteur de l'angiogenèse mais aussi de l'EMT. Le VEGF stimule l'expression de SNAIL dans les cellules de cancers du sein, inhibant partiellement l'activité de GSK3 β (Wanami et al., 2008); de même qu'il est corrélé avec SNAIL, SLUG et TWIST au cours de l'EMT des carcinomes pancréatiques (Yang et al., 2006a). De plus, SNAIL augmente l'expression du VEGF, possiblement en conférant un rétrocontrôle positif de l'EMT (Peinado et al., 2004b). L'EMT induite par le VEGF peut ainsi être reliée à la transition endothélio-mésenchymateuse par l'angiogenèse, qui peut grandement profiter des processus de progression et d'invasion tumorale.

4. Les autres signaux extracellulaires qui régulent l'EMT

Figure 20 : Les voies de signalisation impliquées dans l'EMT

D'autres facteurs de différenciation activent ou régulent l'EMT, bien que les mécanismes sous-jacents ne soient pas bien définis. Dans la signalisation canonique de WNT, sa liaison au récepteur Frizzled (FZD) provoque l'inhibition de GSK3 β , prévenant la phosphorylation, l'ubiquitination et la dégradation de la β caténine, lui permettant de réguler l'expression du génome (Niehrs, 2012). L'inhibition de GSK3 β stabilise SNAIL, favorisant l'EMT (Zhou et al., 2004). La signalisation de WNT est impliquée dans l'EMT embryonnaire. Les souris déficientes pour WNT3 ne forment pas de ligne primitive ni de mésoderme (Liu et al., 1999), alors que l'expression ectopique de WNT8C induit la formation de multiples lignes primitives (Popperl et al., 1997). La signalisation canonique de WNT permet aussi la génération et la prolifération des précurseurs de la crête neurale (Garcia-Castro et al., 2002), alors que sa signalisation indépendante de GSK3 β est requise pour la migration de cellules de cette même crête neurale (Carmona-Fontaine et al., 2008). La signalisation de WNT favorise aussi l'EMT associée au cancer, l'expression des gènes induit par la β caténine étant augmentée dans les cellules invasives des tumeurs colorectales lorsque l'EMT survient (Brabletz et al., 2001).

Dans la signalisation Hedgehog (HH), la liaison du ligand aux récepteurs PTC est liée aux facteurs de transcription GLI (glioma family transcription factor) (Briscoe and Therond, 2013). Au cours du développement, les cellules du somite ventral effectuent une transition en mésenchyme pour former le sclerotome, où SHH (sonic hedgehog) induit l'expression des marqueurs cellulaires sclerotomiques (Monsoro-Burq, 2005). L'expression ectopique de GLI1 dans l'épithélium rénale de rat

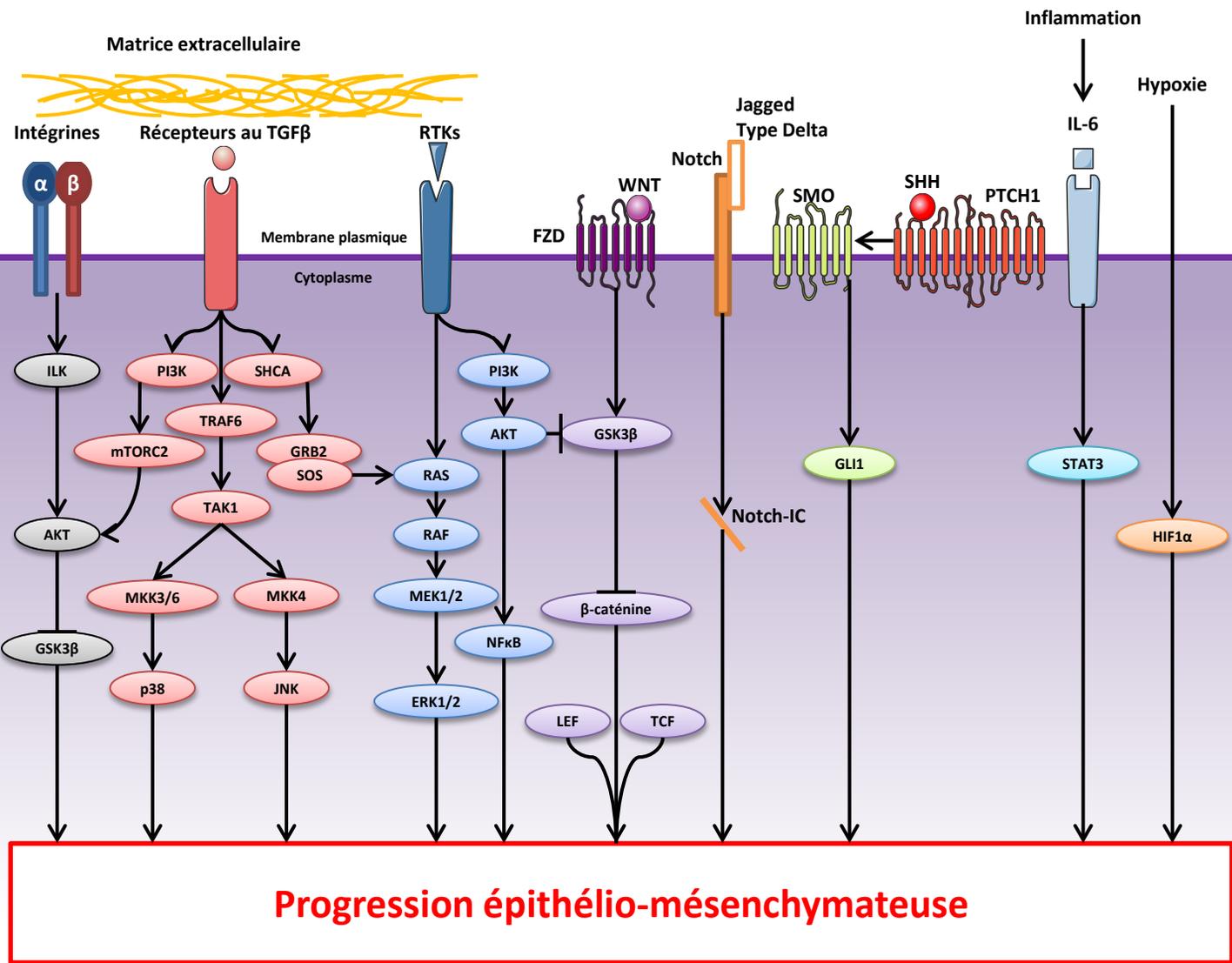


Figure 20 : Les voies de signalisation impliquées dans l'EMT
 Adaptée de Lamouille et al., 2014

induit l'expression de SLUG, la perte de la cadhérine E (Li et al., 2006), l'augmentation de l'expression de SHH et une signalisation associée à l'augmentation de SNAIL dans les cancers épithéliaux (Fendrich et al., 2007).

La signalisation Notch participe aussi dans l'EMT du développement, et possiblement dans l'EMT de la progression cancéreuse. L'interaction des ligands type Delta ou Jagged avec les récepteurs Notch initie une signalisation via la libération protéolytique de Notch dans le domaine intracellulaire qui régule ensuite l'expression de ses gènes cibles (Hori et al., 2013). Dans le développement, la signalisation Notch est requise pour l'EMT dans la formation des coussins endocardiaux. Les souris déficientes pour Notch1 présentent une réduction de l'expression de SNAIL1 et une formation défectueuse des coussins endocardiaux (Timmerman et al., 2004). De plus, le domaine intracellulaire de Notch active directement l'expression de SLUG (Niessen et al., 2008). L'inhibition de Notch1 inverse partiellement l'EMT des adénocarcinomes pulmonaires et diminue leur comportement invasif (Xie et al., 2012).

Des facteurs additionnels du microenvironnement tissulaire ou tumoral peuvent également faciliter l'initiation de l'EMT. Par exemple, les conditions hypoxiques des tumeurs facilitent l'EMT en induisant des facteurs tels HIF1 α , qui activent l'expression de TWIST et ainsi initie l'EMT qui amènera au phénotype invasif (Yang et al., 2008). HIF1 α induit également l'expression de SNAIL dans les cellules endothéliales et les carcinomes des ovaires, provoquant la perte respectivement de la cadhérine VE (VE pour vascular endothelial) et E (Imai et al., 2003; Luo et al., 2011). La libération de cytokines inflammatoires, en dehors du TGF β 1, par les cellules immunitaires, endothéliales et par les CAFs, contribue à l'EMT. Par exemple, l'IL-6 favorise l'EMT des cellules de cancer du sein en culture, ce qui concorde avec la diminution de la cadhérine E, l'augmentation de la cadhérine N, de la vimentine, de SNAIL et de TWIST, augmentant l'invasion (Sullivan et al., 2009). L'expression ectopique de TWIST dans ces cellules induit la production d'IL-6 et active le facteur de transcription STAT3 (signal transducer and activator of transcription 3) (Sullivan et al., 2009), qui active l'expression de SNAIL (Yadav et al., 2011).

Le mécanisme par lequel les cytokines inflammatoires autres que le TGF β contribuent à l'EMT reste à être mieux défini, même si certaines cytokines peuvent induire la signalisation de NF- κ B pour directement activer l'expression de SNAIL ou ZEB (Jing et al., 2011). Considérant le lien entre inflammation et fibrose, ces cytokines inflammatoires peuvent certainement contribuer à l'EMT dans la fibrose.

E. L'EMT et la résistance thérapeutique des cancers

Le lien entre EMT et résistance thérapeutique a été mis en évidence depuis longtemps, mais le mécanisme exact est encore mal compris. Cependant, les études sur les cellules souches cancéreuses (CSCs) ont permis de nombreuses avancées dans la caractérisation de la résistance induite par l'EMT.

Les CSCs sont des petites sous-populations de cellules au sein des tumeurs, responsables de la tumorigénèse (Singh et al., 2004). De nombreuses similarités existent entre les voies de signalisation impliquées dans les CSCs et celles activées au cours de l'EMT, telles que les voies WNT, Hedgehog et Notch. Ces voies sont critiques pour l'auto-renouvellement et le maintien des CSCs (Huber et al., 2005). Des preuves empiriques suggèrent que les cellules réalisant une EMT gagnent des propriétés proches des cellules souches, et ainsi partagent avec les CSCs des voies de signalisations clef et un phénotype résistant aux thérapies (Mani et al., 2008; Singh and Settleman, 2010).

1. L'efflux cellulaire et les transporteurs ABC

L'un des mécanismes principaux de la résistance thérapeutique des CSCs est l'efflux excessif des drogues par les transporteurs membranaires, tels que la famille des transporteurs ABC (ATP-binding cassette). Au moins trois membres de cette famille sont connus pour être impliqués dans la résistance thérapeutique : MDR1 (multi drug resistance 1), MRP1 (MDR-associated protein 1) et BCRP (breast cancer resistance protein) (Gottesman et al., 2002). Ces transporteurs ont un vaste spectre de substrats (Aller et al., 2009; Munoz et al., 2007; Natarajan et al., 2012), origine de la résistance thérapeutique qu'ils supportent. Les cellules effectuant l'EMT sur-expriment les transporteurs ABC et présentent un phénotype similaire aux CSCs. Il a ainsi été démontré que les promoteurs des transporteurs ABC contenaient plusieurs sites de liaisons pour les facteurs de transcription de l'EMT (Saxena et al., 2011). La surexpression de facteurs de transcription tels que TWIST, SNAIL et FOXC2 augmentent l'activité des promoteurs et l'expression des transporteurs ABC dans les cellules de cancer du sein. Ces cellules montrent une résistance dix fois supérieure au traitement à la doxorubicine, comparées à des cellules non transfectées (Saxena et al., 2011).

2. La résistance à l'apoptose

Un autre mécanisme important de la résistance thérapeutique induite par l'EMT est le gain de la résistance à l'apoptose induite par les drogues. Les inhibiteurs des tyrosines kinases de l'EGFR, comme l'erlotinib et le gefitinib, sont communément utilisés dans le traitement des cancers du poumon non à petites cellules (NSCLC). Ces inhibiteurs peuvent lier le site de liaison à l'ATP de l'EGFR,

diminuant son activité et induisant l'apoptose. Il a ainsi été rapporté que l'EMT pouvait induire la résistance des cellules cancéreuses aux inhibiteurs des tyrosines kinases de l'EGFR (Lin et al., 2014; Uramoto et al., 2010), alors que la restauration de la cadhérine E augmentait la sensibilité des cellules au traitement (Witta et al., 2006).

De plus en plus de preuves suggèrent que les facteurs de transcriptions spécifiques de l'EMT peuvent également inhiber l'apoptose induite par les inhibiteurs des tyrosines kinases de l'EGFR. SLUG est suspecté de conférer la résistance au gefitinib en inhibant l'expression de BIM et en augmentant l'activité de la caspase 9 dans les NSCLC (Chang et al., 2011). La surexpression de Notch1 est associée à l'EMT dans la résistance acquise au gefitinib, protégeant les cellules mutantes pour l'EGFR de l'apoptose (Xie et al., 2013).

3. Le rôle du microenvironnement

Le microenvironnement tumoral peut aussi être un facteur de la résistance thérapeutique induite par l'EMT. Les fibroblastes associées au cancer (CAFs), composants du stroma tumoral, jouent un rôle important dans la prolifération et l'invasion des cellules cancéreuses par interaction cellule-cellule et la production de molécules de signalisation extracellulaire (Bremnes et al., 2011). Ces CAFs facilitent l'initiation de l'EMT via la production de cytokines, comme l'IL-6 et TCF21 (Guan et al., 2014; Sui et al., 2014).

L'hypoxie est un autre facteur important du microenvironnement tumoral capable de favoriser l'EMT et la résistance thérapeutique. L'activation d'HIF1 α en condition hypoxique induit l'EMT dans le carcinome hépatocellulaire (HCC) et l'acquisition de résistance aux drogues par l'augmentation de l'expression de MDR1 (Jiao and Nan, 2012). L'extinction d'HIF1 α inverse le phénotype de l'EMT et abolit la résistance thérapeutique des HCC sous hypoxie.

F. Mélanome et transition de phénotype de type EMT

La transition épithélio-mésenchymateuse est une étape critique dans la formation de l'embryon, et un processus similaire est particulièrement important pour la différenciation du lignage mélanocytaire. Elle implique la restructuration du cytosquelette, de la membrane plasmique et des jonctions cellule-cellule. Cette plasticité permet aux mélanocytes d'émerger de la crête neurale (Baker et al., 1997). Un changement de phénotype présentant des similarités avec ce programme d'EMT embryonnaire survient lors de l'acquisition des propriétés métastatiques du mélanome dans la phase verticale de croissance (Bennett, 2008). En comparant des mélanomes cutanés primaires de patients qui ont développés des métastases avec ceux de patients non métastatiques, il est possible

d'observer une différence d'expression des marqueurs épithéliaux et mésenchymateux (Alonso et al., 2007). Au niveau de l'expression des gènes, une perte de la cadhérine E en parallèle du gain de la cadhérine N et SPARC sont significativement associés au développement de métastases (Alonso et al., 2007). De nombreuses preuves étayent la transition de phénotypes au cours de la progression du mélanome et la formation de métastases *in vivo* (Hoek et al., 2008).

1. Les inducteurs de la transition de phénotype du mélanome

Le concept d'EMT a été introduit pour décrire une transition progressive caractérisée par un statut mésenchymateux intermédiaire et la fluctuation d'expression des marqueurs de l'EMT, comme dans les carcinomes du sein, du colon et des ovaires (Huang et al., 2013). Etant donné la nature mésenchymateuse intermédiaire du mélanome, la fluctuation de l'expression des marqueurs de l'EMT ont été observés.

Les facteurs de transcriptions de l'EMT ont un rôle important dans la transition de phénotype du mélanome (Vandamme and Berx, 2014). L'induction de ZEB1, des membres de la famille SNAIL, et la répression de la cadhérine E surviennent lors de la progression du mélanome. Le paradigme traditionnel des cancers épithéliaux est que les facteurs de transcriptions de l'EMT SNAIL1/2, ZEB1/2 et TWIST agissent comme des répresseurs de la cadhérine E, induisant effectivement l'EMT (Thiery et al., 2009). Cependant, à la différence des cancers épithéliaux, dans le mélanome ZEB1 et ZEB2 sont exprimés différemment entre les stades phénotypiques (Caramel et al., 2013) : les mélanocytes normaux expriment faiblement ZEB1 et fortement ZEB2, alors que dans le mélanome on retrouve de hauts niveaux de ZEB1 et peu de ZEB2. L'analyse d'une large série de patient par immunohistochimie révèle une forte expression de ZEB1 et TWIST1, avec une faible expression de ZEB2, le tout correspondant à une baisse significative du taux de survie (Caramel et al., 2013; Denecker et al., 2014). Il est également démontré que la perte de ZEB2 dans les mélanocytes induit leur dédifférenciation, et qu'elle provoque dans les cellules de mélanome l'augmentation de l'expression de ZEB1, réprime la cadhérine E et contribue à la progression et à la formation des métastases (Denecker et al., 2014). Ceci suggère que ZEB2 peut faire fonction de facteur de différenciation, via le maintien de la cadhérine E. Ces études rapportent également que le marqueur de différenciation mélanocytaire MITF est régulé lors de la transition d'expression de ZEB1/ZEB2. Une diminution de MITF peut mener à un phénotype invasif, ce qui est cohérent avec la littérature (Hoek et al., 2008; Vandamme and Berx, 2014). La comparaison des profils d'expression d'échantillons de patients métastatiques et non métastatiques confirme l'importance de la transition entre la cadhérine E et N dans la progression du mélanome (Alonso et al., 2007). La relevance de cette transition est établies

dans les cancers mélanocytaires (Krengel et al., 2004), avec l'induction de SPARC qui augmente l'expression de SLUG, favorisant les capacités invasives du mélanome (Fenouille et al., 2012). Dans le mélanome, SLUG est un activateur transcriptionnel direct de ZEB1, aboutissant à la répression de la cadhérine E (Wels et al., 2011).

La transition de phénotype dans le mélanome peut être initié par des mécanismes différents de ceux caractérisant l'EMT. Dans les lignées de cancers épithéliaux, l'augmentation de la transcription de LEF1 par la β -caténine peut induire l'EMT, cela étant réversible en cas de retrait de LEF1 (Kim et al., 2002). Dans le mélanome, les facteurs LEF1 et TCF4, qui interagissent avec la β -caténine, voient leur expression inversement corrélée. La perte de LEF1 et le gain de TCF4 sont associés avec la progression tumorale, induisant une transition de phénotype prolifératif à invasif (Eichhoff et al., 2011). Le complexe β -caténine/LEF1 est régulé par la voie Wnt et active MITF (Larue and Delmas, 2006). MITF est un gène au rôle critique dans le développement du mélanocyte et dans la progression du mélanome (Levy et al., 2006; Steingrimsson et al., 2004). Ainsi, MITF peut contrôler la différenciation des cellules de mélanome et leur prolifération par arrêt du cycle cellulaire (Loercher et al., 2005; Wellbrock et al., 2008). De plus, l'activation de Wnt peut induire via la PKC une transition de type EMT et augmenter la migration du mélanome, différemment de sa signalisation classique (Dissanayake et al., 2007).

Figure 21 : Les inducteurs de la transition phénotypique du mélanome

Adapté de (Li et al., 2015)

Inducteurs de la transition	Conséquences	Type de mélanome
↓ZEB2	↓Métastases	Multiplés
↑ZEB1&TWIST/↓ZEB2&SLUG	↓Métastases	Multiplés
↑MITF	Différenciation	Cutané
EGF/STAT3	Croissance et métastases	Cutané
WNT5A/↑ROR2	Invasion	Cutané
MET/Exosome	Métastases	Cutané
↑TCF4/↓LEF1	Invasion	Cutané
↓MITF	Invasion	Cutané
WNT5A/PKC	Migration	Cutané
FGF2/↓FAK	Migration	Cutané
↓E-Cadh/↑N-Cadh	Métastases	Cutané
↑E-Cadh	Invasion	Uvéal
HGF/Fibronectine	Migration	Cutané

2. Les voies de signalisation impliquées dans la transition de phénotype du mélanome

Les signalisation de Wnt et Notch ont des rôles bien caractérisés dans le développement des cellules de la crête neurale (Cornell and Eisen, 2005; Wu et al., 2005). Ces voies de signalisation embryonnaires sont également impliqués dans les fonctions tumorales des cellules de mélanome (Takebe et al., 2011). Notamment, le mélanome présente un grand nombre de mutations activatrices de la voie des MAP kinases, les mutations de BRAF et de NRAS étant les plus représentées (voir partie I). Les voies MAPK et PI3K sont connues pour activer NF- κ B, qui induit SNAIL et un phénotype mésenchymateux dans les cellules épithéliales (Lin et al., 2010a), mais il manque encore la preuve de l'existence de ce mécanisme dans le mélanome (Massoumi et al., 2009), même s'il a été démontré que SNAIL induisait un phénotype de type mésenchymateux dans le mélanome (Kudo-Saito et al., 2009). Il est cependant suggéré que les RTKs (Récepteurs à Tyrosine Kinase) pourraient servir d'intermédiaire pour activer NF- κ B/SNAIL étant donné qu'elles activent les voies MAPK et PI3K.

De nombreuses preuves lient la signalisation des RTKs aux capacités migratoires, invasives et métastatiques des cellules de mélanome. L'extinction de l'EGF dans les cellules de mélanome qui le surexprime diminue les métastases aux ganglions lymphatiques, une étape clef de la progression tumorale (Bracher et al., 2013). A la différence des mélanocytes, les cellules de mélanome sécrètent le facteur de croissance FGF2, qui active le récepteur FGFR1. FGF2 favorise la migration des cellules de mélanome en diminuant l'expression de FAK, induisant ainsi une perte de l'adhésion cellulaire (Chalkiadaki et al., 2009). Comme dit précédemment, la transition des cadhérines E/N est un important marqueur de cette transition de phénotype type EMT dans le mélanome. La signalisation du HGF participe à cette transition des cadhérines via l'augmentation de SNAIL et TWIST (Koefinger et al., 2011). De plus, la signalisation du HGF peut aussi induire la synthèse de fibronectine, favorisant la transformation et la migration des cellules de mélanome (Gaggioli et al., 2005). L'IGF-1 peut également induire la migration, via l'augmentation de la production d'IL-8 des cellules de mélanome (Satyamoorthy et al., 2002). Dans les patients de mélanomes uvéaux, il y a corrélation entre une forte expression du récepteur à l'IGF-1 et les métastases (All-Ericsson et al., 2002).

Le TGF- β est l'inducteur d'EMT le plus étudié, avec un rôle établi dans la régulation du remodelage de la matrice extracellulaire et dans son influence du phénotype cellulaire (Derynck and Zhang, 2003; Zavadil and Bottinger, 2005). De plus, le TGF- β peut activer SNAIL et SLUG via SMAD3 de manière Rho-dépendante (Morita et al., 2007). L'augmentation de la signalisation du TGF- β est impliquée dans la résistance à l'inhibition de nombreux oncogènes. La perte de MED12, un

répresseur de la signalisation de TGF- β 2, non seulement confère un phénotype mésenchymateux, mais induit aussi une résistance aux inhibiteurs d'ALK, de l'EGFR et de BRAF dans de nombreux cancers, dont le mélanome (Huang et al., 2012b).

3. Implications de la transition de phénotype dans la réponse aux thérapies

L'adaptation du mélanome aux différentes thérapies qui le ciblent peuvent impliquer les transitions de phénotypes, comme la transition de type EMT. Ainsi, la transition d'expression entre ZEB1 et ZEB2 décrit précédemment peut être initié et soutenu par une signalisation MAPK/ERK via FRA-1, un composé du complexe AP-1 régulé par ERK (Caramel et al., 2013). Ainsi, les changements d'expressions de ZEB1, ZEB2 et TWIST peuvent être inversés par l'inhibition pharmacologique de la signalisation BRAF/ERK. En considérant ces résultats avec ceux concernant l'association TGF- β /MED12 (Huang et al., 2012b), il apparaît de plus en plus indéniable que la transition de phénotype du mélanome a de profondes implications dans la réponse thérapeutique.

La question de savoir s'il était intéressant de cibler cette transition de type EMT dans le traitement du mélanome. Trois stratégies majeures ont été proposées pour répondre à cette question. Considérant l'agressivité du mélanome, la première suggère une approche par réduction du potentiel invasif. Des composés comme l'EGCG (Epigallocatechin gallate) ont des effet inhibiteurs de la migration et de l'invasion de la lignée A375 (mutée pour BRAF), avec une inversion des changements du phénotype type EMT orchestrée par une induction de la cadhérine E et la suppression de la cadhérine N (Singh and Katiyar, 2011). Une autre stratégie repose sur l'utilisation de la transition phénotypique comme méthode capable d'induire des changements dans le mélanome pour le rendre plus facile à cibler par les traitements. Comme évoqué précédemment, une haute expression de MITF dans le mélanome est associée avec un phénotype prolifératif. L'agent chimiothérapeutique MTX (methotrexate) cause l'augmentation de MITF et de la tyrosinase, sa cible directe, inhibant le potentiel invasif des cellules de mélanome. Ceci rend possible le traitement par antifolate, une pro-drogue processée par la tyrosinase, qui induit une apoptose spécifiquement dans les cellules traitées au MTX exprimant fortement MITF et la tyrosinase (Saez-Ayala et al., 2013). La troisième approche est basée sur le succès des thérapies ciblant la signalisation BRAF/MAPK dans le mélanome. La transition de phénotype, la migration cellulaire et l'invasion se développent indépendamment ou parallèlement de l'acquisition de résistances thérapeutiques (Huang et al., 2012b). Ainsi, la stratégie est de combinée une inhibition de la transition de phénotype et de la migration cellulaire en conjonction de thérapies telles que le vemurafenib, qui cible l'oncogène

BRAF et mène à l'arrêt de la croissance et/ou à la mort cellulaire. Des études révèlent que la combinaison d'inhibiteurs du TGF β 2 avec le vemurafenib permet de surpasser la résistance au traitement induite par le TGF β (Huang et al., 2012b). L'inhibition chronique de BRAF provoque également l'augmentation de la signalisation Wnt et favorise l'expression de l'inducteur d'EMT WNT5A. L'extinction de WNT5A abolie la résistance causée par le traitement chronique de vemurafenib (Anastas et al., 2014).

Etant donné que la signalisation des nombreuses RTKs peut induire la transition de phénotype et promouvoir la migration via des mécanismes distincts de la prolifération dépendante de BRAF/MAPK et des facteurs de transcriptions de l'EMT, il semble logique de cibler une sélection de voies de signalisations issues de RTKs en combinaison avec des inhibiteurs de BRAF. Par exemple, la signalisation de l'EGF confère une résistance à l'inhibition de BRAF et induit l'invasion dans le mélanome via la voie SRC. L'inhibition du récepteur à l'EGF et de SRC resensibilise les cellules de mélanomes résistantes au vemurafenib et bloque leur potentiel invasif (Girotti et al., 2013). L'HGF sécrété par les cellules stromales du microenvironnement tumoral peut activer le récepteur MET, initiant la signalisation MAPK/PI3K et conférant une résistance à l'inhibition de BRAF. Ainsi, une double inhibition du HGF ou de MET peut supprimer la résistance (Straussman et al., 2012). Ceci pourrait être d'une importance particulière en relation avec les exosomes issus de mélanome, capable de conférer des propriétés métastatiques à des progéniteurs de moelle osseuse via MET (Peinado et al., 2012). Les exosomes sont un important mécanisme d'export maintenant compartimentées les molécules. Dans de nombreux cancers incluant le mélanome, les exosomes dérivés des cellules tumorales contiennent de nombreux facteurs oncogénique influençant l'EMT et les capacités métastatiques (Vella, 2014). Interférer avec les régulateurs de la formation des exosomes permet de réduire la formation de métastases (Peinado et al., 2012).

III. SYK : Spleen tYrosine Kinase

A. Les Protéines Tyrosine Kinases (PTKs)

Les Protéines tyrosine kinases sont des enzymes dont l'activité catalytique est spécialisée dans la phosphorylation de résidus tyrosines, présents sur leurs nombreux substrats, à partir de molécule d'ATP, cette réaction étant réversible par le biais de protéines tyrosine phosphatases. Les PTKs représentent 17% du "kinome" humain et sont donc d'importants acteurs de la transmission des signaux cellulaires. Elles sont impliquées dans le contrôle de nombreux mécanismes comme le métabolisme énergétique, la progression du cycle cellulaire, le réarrangement du cytosquelette, l'expression génique et l'apoptose. De manière intéressante, la dérégulation des PTKs a un impact sur la prolifération cellulaire et la survie, de telles altérations étant souvent associées à la tumorigenèse (Hunter, 2009; Krause and Van Etten, 2005).

Ces protéines sont sous-divisées en deux groupes : les Récepteurs Tyrosine Kinases (RTKs) composés de récepteurs transmembranaires à activité tyrosine kinase; et les PTKs localisées au niveau du cytoplasme. Les PTKs cytoplasmiques peuvent généralement s'associer avec des récepteurs membranaires afin de transmettre la signalisation cellulaire. Les PTKs sont classées en familles selon leur homologie avec des domaines ou motifs fonctionnels.

Figure 22 : Les PTKs Humaines

B. Généralités sur SYK

1. Structure

Le gène SYK code pour la protéine du même nom, la Spleen tYrosine Kinase, baptisée d'après le premier site dont la protéine fut extraite (Kobayashi et al., 1990). Le gène est localisé au niveau du chromosome 9q22, pouvant donner par épissage alternatif deux ARNm : SYK(L), ou simplement SYK, et SYK(S), ou SYK-B. La protéine SYK, composée de 635 acides aminés pour un poids de 72 kDa, appartient à la sous-famille SYK/ZAP70.

SYK est composée d'un tandem de domaines SH2 en position N-terminale, séparés par un inter-domaine A (Sada et al., 2001). Un inter-domaine plus long sépare les domaines SH2 du domaine catalytique. Les analyses structurales indiquent la présence de nombreux résidus hydrophobes dans les inter-domaines A et B, ainsi que dans le domaine kinase, qui interagissent et donnent à SYK une conformation auto-inhibée (Gradler et al., 2013).

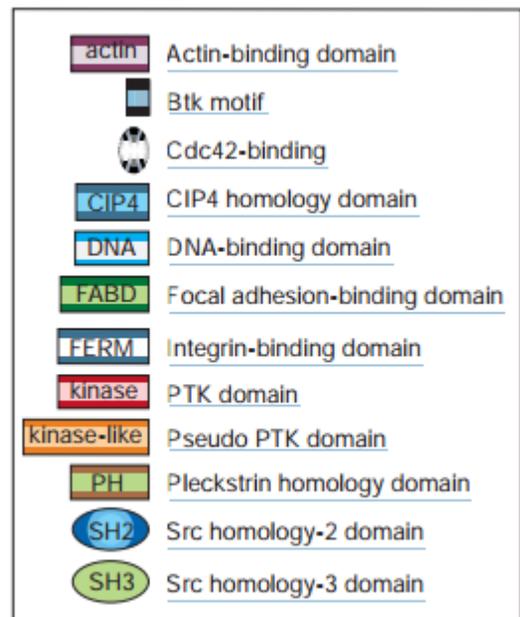
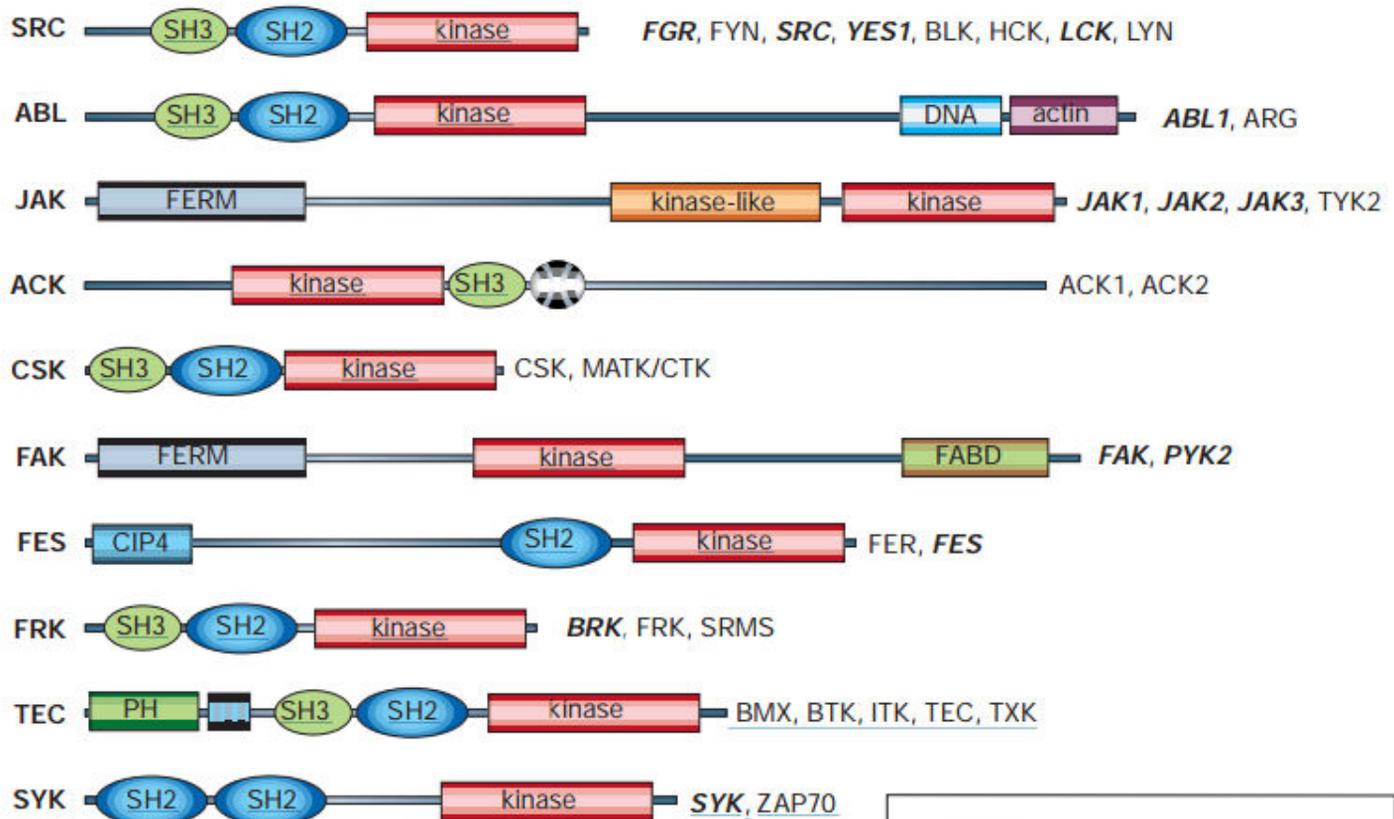


Figure 22 : Les PTKs Humaines

Issue de Blume-Jensen et al., 2001

Les domaines SH2 de SYK reconnaissent les motifs ITAM (séquence ASP/Glu-X-X-Tyr-X-X-Leu-(X)₆₋₈-Tyr-X-X-Leu) (Mocsai et al., 2010) suite à la phosphorylation de leurs tyrosines. Les motifs ITAM se retrouvent sur de nombreux récepteurs couplés à SYK (Abram and Lowell, 2007), particulièrement sur les immunorécepteurs des cellules hématopoïétiques (Turner et al., 2000). Nous pouvons citer par exemple le récepteur à l'antigène des cellules B (BCR ou B cell receptor), les récepteurs aux IgE (FcεR), aux IgG (FcγR), aux IgA (FcαR), le récepteur plaquettaire au collagène (GPVI), le récepteur d'activation des cellule NK et les intégrines via l'association des adaptateurs DAP12 ou FcRγ (Berton et al., 2005).

Figure 23 : Structure de SYK

2. Activation de SYK via ses phosphorylations

SYK est donc principalement activée par son interaction avec un motif ITAM doublement phosphorylé : ceci est engagé par la phosphorylation de la tyrosine en N-terminal des motifs ITAM par un membre de la famille des tyrosines kinases Src permettant le recrutement de SYK au récepteur (Geahlen, 2009; Mocsai et al., 2010). La seconde tyrosine du motif ITAM est ensuite phosphorylée, probablement par SYK, complétant la formation du complexe SYK-récepteur. La liaison au motif ITAM doublement phosphorylé lève l'anti-inhibition de SYK et mène à son activation (Gradler et al., 2013), qui va ainsi pouvoir catalyser la phosphorylation de ses substrats protéiques, en privilégiant les tyrosines situées aux sites riches en acides aminés acides (Geahlen, 2009). Il a également été montré que SYK pouvait, sous certaines conditions, phosphoryler des résidus sérines (Heizmann et al., 2010; Uckun et al., 2012), mais cette fonction n'est pas encore bien comprise.

SYK elle-même présente de nombreuses tyrosines phosphorylables qui peuvent réguler son activité et sa capacité à interagir avec ses substrats protéiques (Geahlen, 2009).

La tyrosine 130 localisée dans l'inter-domaine A permettrait, une fois phosphorylée, de moduler l'interaction de SYK avec les motifs ITAMs des récepteurs. Cette phosphorylation est importante notamment pour augmenter l'activité basale de SYK et sa dissociation du récepteur des lymphocytes B (Keshvara et al., 1997). La mutation Y130E de SYK provoque l'amplification de son activité kinase et découple son activation de l'interaction avec un motif ITAM. De plus, la conservation de ce site de phosphorylation est importante, sa délétion pouvant conduire à une activation indépendante des ITAMs et rendre SYK sourd à la signalisation en aval (Adachi et al., 2007).

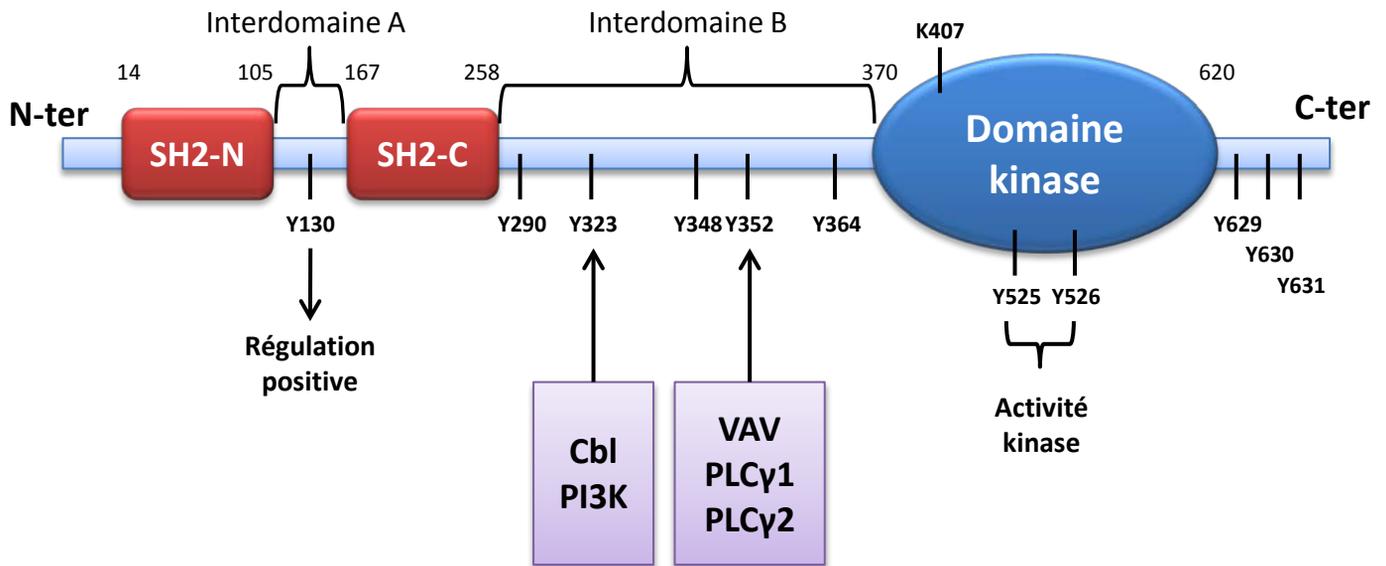


Figure 23 : Structure de SYK

Adaptée de Sada et al.,2001

L'inter-domaine B contient également de nombreux sites de phosphorylation sur tyrosine, ces sites modulant plus particulièrement l'interaction protéine-protéine.

Ainsi la tyrosine 323 est un site de liaison au domaine SH2 de l'ubiquitine ligase c-Cbl, un régulateur négatif en aval de SYK dans les cellules B et les mastocytes (Ota and Samelson, 1997; Sada et al., 2000). Cette tyrosine pourrait également être impliquée dans l'interaction avec le domaine SH2 de la sous-unité p85 de PI3K (Moon et al., 2005).

Les tyrosines 348 et 352 permettent, une fois phosphorylées, d'interagir avec les domaines SH2 de protéines impliquées dans la signalisation cellulaire, telle Vav1 (Deckert et al., 1996), la phospholipase C γ 1 (PLC γ 1) (Law et al., 1996) et la phospholipase C γ 2 (PLC γ 2) (Simon et al., 2005). La phosphorylation de ces résidus est même nécessaire dans les mastocytes pour la liaison de SYK au motif ITAM des immunorécepteurs et l'augmentation de son activité kinase (Zhang et al., 2002).

Le domaine kinase présente de nombreux sites de phosphorylation modulant son activité. Ainsi, le couple de tyrosines 525/526, situé dans la boucle d'activation du domaine kinase, est nécessaire pour la signalisation en aval de SYK après l'activation des immunorécepteurs (Zhang et al., 1998). L'activation de ces deux tyrosines peut être induite par autophosphorylation ou par un intermédiaire comme les kinases Src (El-Hillal et al., 1997).

Trois tyrosines phosphorylables sont présentes dans la partie C-terminale de SYK : Y629/630/631. Leur autophosphorylation régule négativement l'activité kinase de la protéine dans la lymphocyte T (Zeitlmann et al., 1998), tandis que le mutant Tyr 629/630/631 Phe provoque un gain de fonction (le mécanisme restant encore à déterminer). La tyrosine 630 est également phosphorylée lors de l'activation du BCR, et permet la liaison de SYK au domaine SH2 de l'adaptateur SLP65, permettant l'activation des voies en aval (Kulathu et al., 2008). Si les cellules B ne peuvent pas former ce complexe SYK/SLP65, différentes dérégulations surviennent, telles l'incapacité pour AKT d'activer la voie des MAP kinases, la perturbation de la signalisation par le calcium et un blocage du développement cellulaire.

L'implication de SYK dans de nombreuses voies de signalisation fait que sa régulation est très importante, SYK ayant donc tendance à être régulée négativement pour prévenir l'activation constitutive des voies en aval. La tyrosine 323, par exemple, peut se lier à l'ubiquitine ligase c-Cbl, conduisant à la dégradation de SYK par le protéasome. De plus, des protéines tyrosine phosphatase telle SHP-1 peuvent déphosphoryler SYK pour inhiber son activité (Dustin et al., 1999).

3. Epissage alternatif : la forme SYK-B

La transcription de SYK peut aboutir à deux produits d'épissages différents : la PTK classique SYK, ou SYK(L); et une forme raccourcie SYK-B, ou SYK(S). SYK-B se voit amputée de 23 acides aminés (283-305) dans l'inter-domaine B (Wang et al., 2003), affectant intrinsèquement l'activité de la kinase et réduisant son activité, comme cela a été mis en évidence dans la signalisation du BCR (Latour et al., 1996). Si les cibles de SYK-B restent les mêmes que celles de SYK, la délétion semble affecter la capacité de la kinase à se lier aux motifs ITAM phosphorylés, causant la déficience de la signalisation. Cependant, cette perte d'affinité pour les motifs ITAM ne semble pas résulter d'une perte de sites de phosphorylation présents dans la portion amputée (Latour et al., 1998).

Des différences peuvent toutefois être notées entre les localisations de SYK et SYK-B, SYK pouvant se déplacer entre le cytoplasme et le noyau mais SYK-B étant strictement cytoplasmique (Latour et al., 1996; Prinos et al., 2011; Wang et al., 2003). SYK pouvant pénétrer le noyau par interaction avec les histones désacétylases et le facteur de transcription Sp1 (Wang et al., 2005), la région perdue par SYK-B contient vraisemblablement la séquence permettant ce transport (Wang et al., 2003).

SYK-B est coexprimée avec SYK, mais le rapport entre les deux favorise la forme complète SYK. Ainsi, la forme SYK-B est très faiblement exprimée dans les lignées hématopoïétiques (Latour et al., 1996) et complètement absente des cellules épithéliales mammaires (Wang et al., 2003). Mais dans le cas du cancer, il semble que l'expression de SYK-B augmente, comme en témoignent son apparition dans les lignées cellulaires de cancer du sein (Wang et al., 2003), ou encore l'inversion de la balance SYK/SYK-B en faveur de SYK-B dans les carcinomes hépatocellulaires (Hong et al., 2014).

Figure 24 : Structure comparative de SYK avec les autres membres de sa sous-famille

4. ZAP70

La protéine tyrosine kinase ZAP-70 a une structure très proche de SYK, les deux constituant la même sous-famille de PTKs. La principale différence structurale repose sur la délétion dans ZAP-70 de 23 acides aminés par rapport à SYK, la même séquence perdue par SYK-B. D'autres différences ponctuelles existent entre les deux, tel le remplacement de la tyrosine 629, mais ZAP-70 est de fait extrêmement proche de SYK/SYK-B.

ZAP-70 est principalement exprimée dans les cellules T, les cellules NK et les cellules de leucémie lymphoïde chronique B (Colucci et al., 2002; Crespo et al., 2003). ZAP-70 joue un rôle

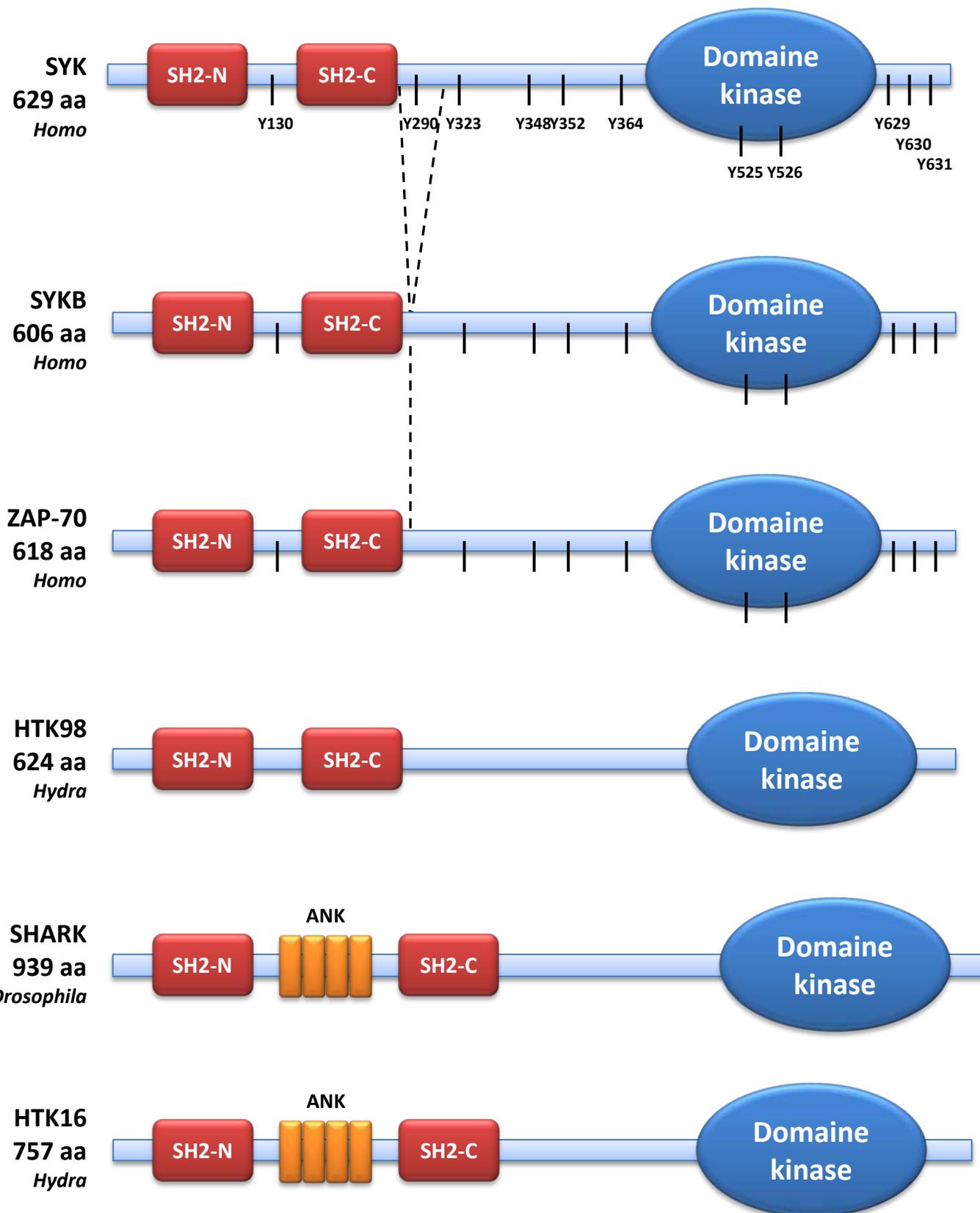


Figure 24 : Structure comparative de SYK avec les autres membres de sa sous-famille

Adaptée de Mocsai et al.,2010

majeur dans le développement et la signalisation des lymphocytes T, mais est un marqueur de mauvais pronostic dans les leucémies lymphoïdes chroniques B.

5. Conservation au cours de l'évolution et développement embryonnaire

La famille de PTK SYK/ZAP-70 a une origine évolutive ancienne, avec toutefois une alternance entre apparition et disparition au cours de l'évolution animale (Steele et al., 1999). *Drosophila melanogaster* exprime une protéine apparentée à SYK, SHARK (SH2 domain ankyrin repeat kinase 4), qui contient des répétitions de domaines ankyrines entre ses domaines SH2. Dans un autre registre, les hydres et les éponges expriment deux kinases apparentées à SYK : HTK98 est similaire à la version de SYK des vertébrés et HTK16, qui est plus proche de SHARK (Steele et al., 1999; Suga et al., 1999). A l'inverse, *Caenorhabditis elegans* ne présente aucune tyrosine kinase apparentée à SYK (Ruvkun and Hobert, 1998).

Cette conservation au cours de l'évolution indique que SYK est importante pour la survie de l'individu, sa perte devant avoir des conséquences majeures. Ainsi, le gène *SYK* invalidé par KO dans la souris induit majoritairement une létalité périnatale, avec de larges hémorragies cutanées (pétéchies) *in utero* ou à la naissance, ainsi que l'absence de cellules B matures (Cheng et al., 1995; Turner et al., 1995). L'hématopoïèse générale n'est pas perturbée, le phénotype hémorragique étant dû à une mauvaise séparation des systèmes sanguins et lymphatiques, menant le premier à s'épancher létalement dans le second (Abtahian et al., 2003). Le partenariat entre SYK et SLP-76 dans les précurseurs des cellules endothéliales serait nécessaire à l'angiogénèse et la lymphangiogénèse. Pour ce qui est du défaut en cellules B matures, il est originaire d'un blocage de la maturation au niveau de la transition entre cellules pro-b et pré-B.

Dans l'état actuel des connaissances, aucun patient humain ou souche animale avec une mutation germinale spontanée de SYK n'a été décrit.

C. Rôle physiologique

1. Les voies de signalisation dépendantes de SYK

Une fois SYK activée par son interaction avec des motifs ITAM, elle va pouvoir interagir avec de nombreux partenaires et induire de nombreuses voies de signalisation. Suit une liste non exhaustive des partenaires et substrats de SYK (Sada et al., 2001)

Figure 25 : Les partenaires de SYK

	Effecteurs/Substrats de SYK	Références
Molécules adaptatrices	LAT	(Saitoh et al., 2000)
	SLP-76	(Hendricks-Taylor et al., 1997)
	BLNK / SLP-65	(Fu et al., 1998)
	BCAP	(Okada et al., 2000)
	HS1	(Yamanashi et al., 1997)
	Shc	(Nagai et al., 1995)
	TCR CD3	(Latour et al., 1997)
	3BP2	(Deckert et al., 1998)
Enzymes	Cbl	(Lupher et al., 1998)
	PLC-γ	(Takata et al., 1994)
	PLD	(Hitomi et al., 1999)
	Btk	(Kawakami et al., 2000)
	Pyk2	(Okazaki et al., 1997)
	Vav1	(Deckert et al., 1996)
	Vav2	(Tartare-Deckert et al., 2001)
	PI3K	(Beitz et al., 1999)
MAPK	(Costello et al., 1996)	
Protéines du Cytosquelette	Tubulin	(Peters et al., 1996)
	SH3P7	(Larbolette et al., 1999)

Certaines des voies induites par SYK sont détaillées ci-dessous dans le modèle le plus décrit lorsque SYK est concernée : la signalisation du BCR.

Figure 26 : Signalisation de SYK dans le BCR

a. BLNK

La protéine BLNK (65 B cell linker protein), aussi nommée SLP-65 (SH2 domain-containing leucocyte protein of 65 kDa) ou BASH (B cell-Specific adaptator protein), a un rôle d'adaptateur et d'effecteur de la signalisation BCR dans le cytoplasme. Une fois SYK activée par le BCR, la kinase recrute BLNK à la membrane et la phosphoryle pour permettre l'activation de nombreuses voies. Effectivement, l'activation de BLNK génère des sites de liaison et permet le recrutement de nombreuses molécules effectrices, telles Vav, GRB2, PLCγ2, NCK et BTK.

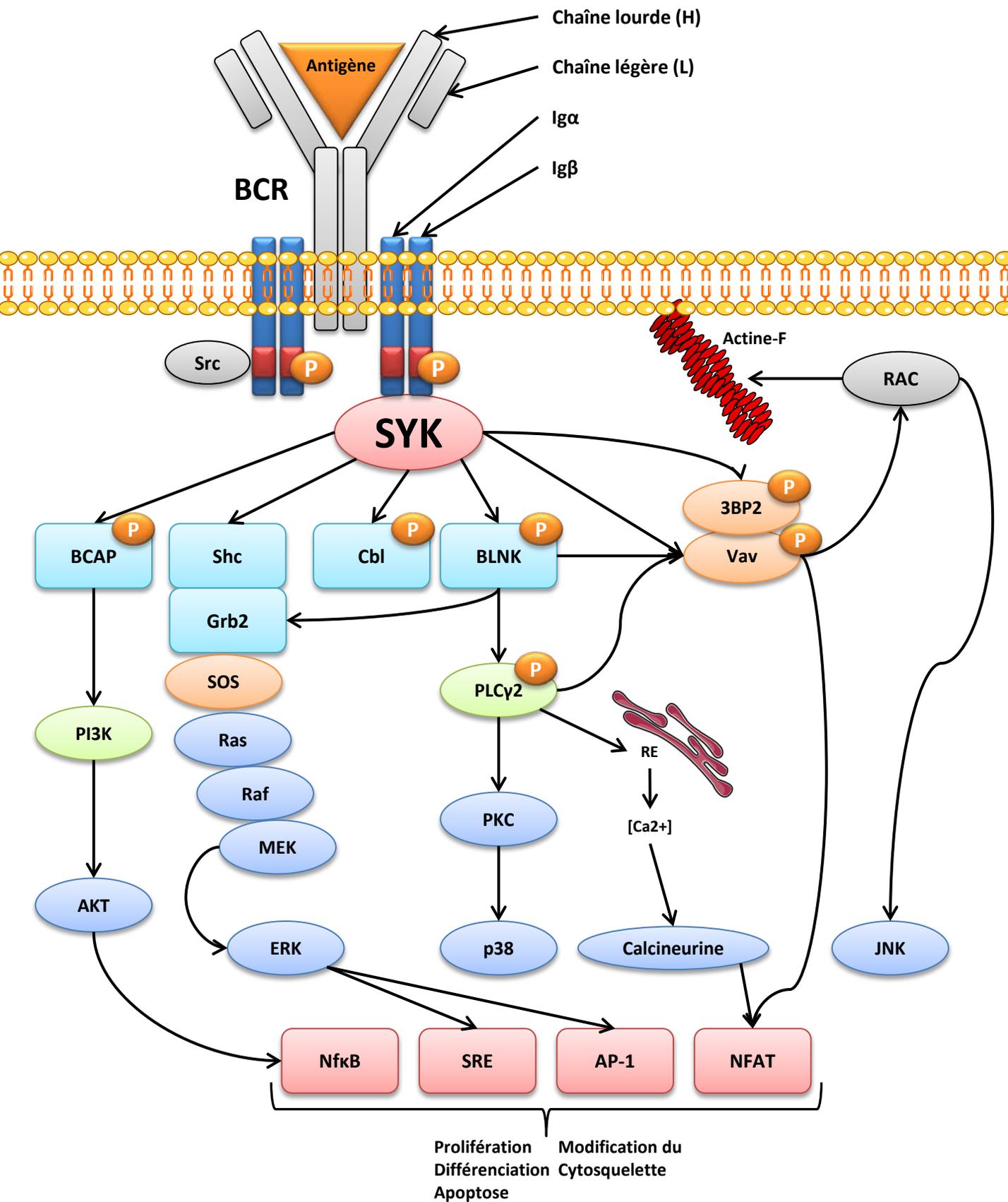


Figure 26 : Signalisation de SYK dans le BCR

Adaptée de Dal Porto et al., 2004 et Foucalt et al., 2005

BLNK sert également à moduler le recrutement d'enzymes régulant le second messager Ca^{2+} et provoquant la transcription des gènes cibles. Il a été montré par une approche de mutation fonctionnelle de BLNK que son domaine SH2 est nécessaire pour que SYK puisse la phosphoryler, qu'elle soit recrutée à la membrane et qu'elle induise l'activation de la voie NFAT (Abudula et al., 2007). BLNK n'est pas seulement un substrat de SYK, elle sert également de partenaire de liaison directe, et elle est activatrice de SYK (Kulathu et al., 2008). Ainsi, BLNK et SYK forment une boucle médiée par la liaison entre le domaine SH2 de BLNK et le site d'auto-activation Y630 de SYK. Suite à l'engagement du BCR, les cellules B incapables de former l'association SYK/BLNK (par exemple suite à une mutation) se voient dans l'impossibilité d'activer les voies ERK, NF κ B et NFAT, l'activation d'AKT restant possible. Le blocage de ce complexe empêche également la maturation des cellules B. De plus, dans les cellules B matures et activées l'association SYK/BLNK est nécessaire pour maintenir la réponse du Ca^{2+} . Une fois le BCR activé et internalisé, SYK peut rester activée dans son complexe avec BLNK à la membrane, aboutissant à une signalisation soutenue.

De plus, indépendamment de son activité kinase, la fonction adaptatrice de SYK est nécessaire pour lier la phosphorylation de BLNK à la réponse du Ca^{2+} (Abudula et al., 2007). Enfin, la régulation entre SYK et BLNK peut être alternativement en aval ou en amont de l'une ou l'autre.

b. La voie des enzymes lipidiques : PI3K et PLC γ

Les enzymes lipidiques PI3K et PLC γ sont des effectrices générant des messagers secondaires en aval de la signalisation BCR et sont liées au métabolisme des phospho-inositides. Ces deux enzymes possèdent des domaines SH2 et sont activées par phosphorylation.

SYK, via sa phosphorylation sur Y323, se lie directement au domaine SH2 de PI3K (Moon et al., 2005). PI3K peut aussi être recrutée par ses domaines SH2 par les adaptateurs BCAP (B-Cell activator for PI3K) ou Cbl, après leur phosphorylation par SYK. De plus, SYK peut être ubiquitinée par Cbl-b lors de sa liaison à sa tyrosine 323, ce qui induit la régulation négative du BCR (Sohn et al., 2003; Yankee et al., 1999).

PI3K convertit les PIP₂ membranaires en PIP₃, activant les PLC γ , AKT et VAV. La voie PI3K/AKT améliore la prolifération et la survie des lymphocytes B (Fruman et al., 1999). SYK mobilise également cette voie anti-apoptotique dans la réponse des lymphocytes B après stimulation par un stress oxydant (Ding et al., 2000).

Les PLC γ sont recrutées par la protéine adaptatrice BLNK activée par SYK via ses domaines SH2, favorisant leur activation par SYK (Fu et al., 1998). PLC γ 1 et PLC γ 2 convertissent les PIP₂

membranaires en messagers secondaires DAG (1,2-diacylglycérol) ou IP3 (1,4,5-triphosphate). Le DAG active les PKC et l'IP3 libère le calcium du réticulum endoplasmique, activant la voie des MAP kinases (ERK/JNK/p38) et des facteurs de transcription tel NFAT. Ceci est médié par la régulation positive de la phosphatase calcineurine par le calcium, qui induit la déphosphorylation de NFAT et permet sa translocation nucléaire, où elle active ses gènes cibles.

c. La voie des MAP kinases

Dans les Lymphocytes B, SYK se lie au BCR après son activation et phosphoryle Shc, qui à son tour recrute GRB2 (Growth factor Receptor-Bound protein 2), Ras et SOS (Son of Sevenless), conduisant à l'activation de la voie Ras/Raf/ERK (Nagai et al., 1995). GRB2 peut être remplacée par BLNK dans l'activation de la voie (Hashimoto et al., 1998).

Une fois activée, ERK active à son tour plusieurs facteurs de transcription nucléaires tels AP-1 et SRE, dépendant aussi de PLC γ , et permettant l'entrée dans le cycle cellulaire et la production de cytokines (Mittelstadt and DeFranco, 1993; Richards et al., 2001).

d. La voie NF- κ B

NF- κ B est un facteur de transcription impliqué dans de nombreux processus cellulaires, par exemple pour protéger des signaux pro-apoptotiques (Barkett and Gilmore, 1999). Dans les lymphocytes B, l'activation anti-apoptotique de NF- κ B nécessite l'activation de PLC γ 2 par BTK et SYK (Oh et al., 2007; Petro and Khan, 2001). SYK régule NF- κ B à court terme par l'augmentation du Ca²⁺ cytoplasmique alors que BTK est impliquée à long terme.

e. La voie Rho

La famille des GTPases Rho est impliquée dans de nombreux mécanismes cellulaires, notamment dans le remaniement du cytosquelette d'actine et dans l'induction de la voie des MAP kinases (Etienne-Manneville and Hall, 2002). Les membres de la famille Vav (1, 2 et 3) sont des facteurs d'échange du GTP régulés par phosphorylation, qui jouent un rôle important dans l'activation de la famille Rho sous la signalisation BCR (Turner and Billadeau, 2002). SYK interagit via sa tyrosine 352 au SH2 de Vav, ce qui induit sa phosphorylation et son activation. Ainsi, dans les lymphocytes T, l'activation de Vav par SYK stimule la voie des MAP kinases et le facteur de transcription NFAT (Deckert et al., 1996) via son association avec 3BP2, un autre substrat de SYK (Foucault et al., 2005). Dans les lymphocytes B, Vav contrôle le cytosquelette d'actine via Rac1

(famille Rho), qui est nécessaire pour l'activation de la cycline D2 et la prolifération (Glassford et al., 2001; Tarakhovsky et al., 1995); mais l'implication de SYK reste à déterminer. Dans les plaquettes, les intégrines $\alpha_{IIb}\beta_3$ activées génèrent la phosphorylation de Vav par SYK, provoquant le réarrangement du cytosquelette (Oberfell et al., 2002).

SYK phosphoryle également de nombreux substrats impliqués dans l'organisation des microtubules du cytosquelette. Les microtubules sont constitués de filaments épais composés d'hétérodimères α/β de tubuline. La signalisation BCR induit la phosphorylation de l' α -tubuline via SYK, mais les conséquences de cette phosphorylation ne sont pas connues (Fernandez et al., 1999).

f. Signalisation non dépendante de l'activité kinase de SYK

Alors que dans les lymphocytes B, la signalisation par le calcium est induite par la phosphorylation de BLNK et PLC γ 2 par SYK, ce second messager peut aussi être généré par la fonction adaptatrice de SYK indépendamment de son activité kinase. Un motif YXDV au niveau de l'extrémité C-terminale de SYK permet de se lier directement à BLNK, comme le ferait PLC γ 2, induisant la mobilisation du calcium (Abudula et al., 2007).

2. Rôle dans les cellules hématopoïétiques

a. Signalisation des récepteurs à motif ITAM

Les immunorécepteurs classiques (BCR, TCR et plusieurs FcRs) effectuent, directement ou indirectement, la reconnaissance adaptative du soi et des antigènes étrangers. Les adaptateurs transmembranaires associés aux immunorécepteurs, voire dans le cas du Fc γ RIIA, le ligand lié à la chaîne du récepteur, peuvent contenir un ou plusieurs ITAMs. La liaison au récepteur mène à la phosphorylation de ces ITAMs, principalement par les membres de la famille Src. Via l'interaction avec leur double domaine SH2, les ITAMs phosphorylés recrutent SYK dans le cas du BCR et des FcR (ZAP-70 dans le cas du TCR), activant la kinase et la signalisation en aval. ZAP-70 est plus dépendant de l'activation par les kinases Src que SYK, probablement car SYK peut phosphoryler de lui-même les ITAMs (Pao et al., 1997; Turner et al., 2000).

Outre la signalisation initiée par la liaison ligand-récepteur, les ITAMs peuvent induire une signalisation constitutive ou tonique. Ceci a été prouvé lors du blocage de la signalisation BCR par l'inactivation des ITAMs portés par les chaînes α , aboutissant à la disparition rapide des cellules B

matures (Kraus et al., 2004). Ceci indique que le maintien des cellules B matures requière l'activation des ITAMs, même en absence de ligands du BCR, d'où une activation tonique. Ainsi, même si il n'a pas encore été montré que SYK était nécessaire à la signalisation tonique, l'effet des inhibiteurs de SYK sur des lymphomes B exprimant le BCR suggère que c'est le cas. Il a également été montré dans les mastocytes que la signalisation par le FcεRI pouvait être induite même en absence d'antigènes (Kitaura et al., 2003; Kohno et al., 2005). Ces réponses nécessitant l'agrégation du récepteur et de SYK, cela semble se conformer à la signalisation conventionnelle ITAM-SYK.

Il a longtemps été supposé que les deux résidus tyrosines phosphorylés constituant le motif ITAM devaient se situer sur la même chaîne peptidique pour recruter et activer SYK. Cependant, il a été montré que SYK pouvait être activée via des récepteurs de type lectine, présentant seulement un motif Tyr-X-X-leu sur leur queue cytoplasmique : par exemple, le récepteur de reconnaissance fongique CleC7A (Rogers et al., 2005), ou le récepteur plaquettaire CleC2 (Suzuki-Inoue et al., 2006). La transduction du signal passe par les domaines SH2 de SYK et par ces hémITAMs (Fuller et al., 2007; Rogers et al., 2005) : les récepteurs porteurs des motifs hémITAMs activent SYK en se dimérisant, liant les deux domaines SH2 de SYK sur les hémITAMs phosphorylés des deux chaînes (Hughes et al., 2010).

b. Signalisation des récepteurs sans motifs ITAM

De nombreux récepteurs, autres que les immunorécepteurs, peuvent activer SYK sans porter eux-mêmes des motifs ITAMs. En exemple, nous pouvons citer les Intégrines ou les récepteurs aux chimiokines, qui ne contiennent pas de motifs ITAM mais s'associent à des adaptateurs à motifs ITAM, comme DAP12 et FcRγ (Mocsai et al., 2006), aboutissant à l'activation de SYK dans plusieurs types cellulaires (Abram and Lowell, 2007).

Il a été montré dans les macrophages et les neutrophiles que SYK est activée par l'intégrine β2 via son interaction avec les adaptateurs DAP12 et de FcRγ (Mocsai et al., 2006). Différemment, l'intégrine plaquettaire α_{IIb}β3 peut engager et activer SYK indépendamment de ses domaines SH2 (Gao et al., 1997). Ces résultats suggèrent que même au sein des intégrines différents modes de signalisation engageant SYK sont possibles. Toujours dans les plaquettes, lors de leur étalement sur fibrinogène, SYK peut se lier aux intégrines β3 non phosphorylées par son domaine SH2 en N-terminal et par l'inter-domaine A (Woodside et al., 2002). Cependant, ces observations n'écartent pas la possibilité d'une phosphorylation intermédiaire de SYK par des protéines contenant des motifs ITAM.

Le M-CSF (Macrophage Colony-Stimulating Factor) se lie au récepteur tyrosine kinase c-Fms dans les ostéoclastes, participant à la régulation du cytosquelette via l'adaptateur DAP12 et SYK (Zou et al., 2008).

Le récepteur membranaire PSGL-1 (P-selectin glycoprotein ligand-1), exprimé dans les cellules myéloïdes, se lie aux protéines ERM (Ezrine, Radixine et Moésine), provoquant la phosphorylation de leur motif ITAM. Les ERM sont connues pour faire le lien entre la membrane plasmique et le cytosquelette d'actine, servir d'adaptateurs et induire l'activation de SYK (Urzainqui et al., 2002).

La chimiokine CXCL12/SDF1 (Stroma-Derived Factor 1) est impliquée dans la polarité et la migration des cellules hématopoïétiques, activant SYK dans les lymphocytes B (Matsusaka et al., 2005) et ZAP-70 dans les lymphocytes T (Ticchioni et al., 2002). Les mécanismes d'action aboutissant à l'activation de SYK par CXCL12 ne sont pas encore connus mais pourraient faire intervenir des adaptateurs contenant des motifs ITAM comme DAP12 et FcR γ .

c. Signalisation activée par le stress oxydatif

Le stress oxydatif est généré par de nombreux processus physiologiques et pathologiques, mais peut aussi être causé par des stress environnementaux comme les rayonnements UV ou ionisants, ou encore induit par des traitements. Il survient quand la concentration en radicaux libres et en ROS (Reactive Oxygen Species) dépassent les capacités anti-oxydantes cellulaires. De nombreuses pathologies découlent du stress oxydatif, pouvant devenir cytotoxique ou perturber les voies de signalisation (Thannickal and Fanburg, 2000).

Le stress oxydatif peut ainsi activer une signalisation, indépendamment de l'activation des récepteurs, par l'inhibition des tyrosines phosphatases, qui conduit à l'activation de tyrosines kinases comme SYK et ZAP-70 (Schieven et al., 1993; Schieven et al., 1994). Dans les lymphocytes B, le traitement à l'H₂O₂ induit une activation de SYK dépendante de Lyn, kinase de la famille Src (Qin et al., 1996). Toujours dans ces cellules, la concentration en H₂O₂ induira, via l'activation de SYK, des voies pro ou anti-apoptotiques (Tohyama et al., 2004).

3. Rôle dans les cellules non hématopoïétiques

SYK joue un rôle majeur dans les cellules du lignage hématopoïétique, avec une influence sur de nombreux mécanismes allant de la prolifération à la différenciation et la phagocytose. Cependant,

les récepteurs activant SYK, comme les intégrines, sont présents dans de nombreuses cellules non-hématopoïétiques, ce qui laisse supposer un rôle de SYK dans ces types cellulaires.

On retrouve l'expression de SYK dans les cellules endothéliales vasculaires : il est indispensable à leur prolifération, leur migration et leur survie. L'inactivation de SYK chez la souris induit une mort périnatale par pétéchie : les cellules endothéliales vasculaires présentant d'importantes anomalies morphologiques (Inatome et al., 2001; Yanagi et al., 2001) et la glycoprotéine VI (GpVI), un récepteur au collagène des plaquettes, voit son expression perturbée (Mocsai et al., 2010). Ces deux défauts engendrés par le KO de SYK entraînent un défaut de la séparation des systèmes vasculaires et lymphatiques, cause de la pétéchie.

SYK est exprimée dans plusieurs types de cellules épithéliales. Elle est présente dans l'épithélium mammaire humain et murin (Coopman et al., 2000; Fluck et al., 1995). SYK est exprimée dans le tissu mammaire normal, les lésions et hyperplasies bénignes, mais est perdue progressivement en cas de transformation tumorale. Les cellules épithéliales bronchiques expriment SYK, dans lesquelles elle participe à la signalisation inflammatoire en aval de l'intégrine $\beta 1$ et du TNF (Ulanova et al., 2006; Ulanova et al., 2005). De même, SYK s'exprime dans l'épithélium gastrique (Wang et al., 2004) et dans les cellules épithéliales squameuses de la tête et du cou (Luangdilok et al., 2007).

SYK participe à la différenciation des fibroblastes embryonnaires de souris 3T3-L1 en adipocytes, son activité étant impliquée dans l'adipogénèse (Wang and Malbon, 1999).

Dans les fibroblastes de la muqueuse nasale, l'expression de SYK est associée à la production de la chimiokine RANTES (Regulated on Activation, Normal T cell Expressed and Secreted) lors de la stimulation par du LPS (lipopolysaccharide), qui est porté par la paroi des bactéries à Gram négatif (Yamada et al., 2001). RANTES participe à la réponse inflammatoire en recrutant et activant les éosinophiles.

SYK est impliquée dans l'activation de la voie des MAP kinases dans les hépatocytes humains et murins, via les récepteurs couplés aux protéines G (Tsuchida et al., 2000). Comme pour les cellules endothéliales, les hépatocytes de souris invalidés pour SYK développent des anomalies morphologiques (Yanagi et al., 2001).

SYK est retrouvée dans les cellules neuronales et impliquée dans la différenciation neurale des cellules de carcinomes embryonnaires P19 (Tsujimura et al., 2001).

Les cellules musculaires lisses de rat expriment SYK, qui contrôle la synthèse protéique en réponse à l'angiotensine II, peptide majeur qui régule l'homéostasie et la prolifération cellulaire (Yaghini et al., 2007).

4. Rôle dans la peau

La peau est constituée de nombreux types cellulaires (sa composition et son homéostasie étant décrites plus avant en partie I). SYK est présente dans ces nombreux types cellulaires, comme dans les mélanocytes, les kératinocytes, les cellules épithéliales vasculaires et les cellules immunitaires résidentes.

Dans les mélanocytes, son expression est perdue lors de la transformation en mélanome (Hoeller et al., 2005; Muthusamy et al., 2006), cependant, son rôle physiologique est peu connu. En effet, bien qu'elle semble être impliquée dans le contrôle de la survie cellulaire et avoir un rôle suppresseur de tumeur, sa réexpression est capable d'arrêter la prolifération des cellules et d'induire la sénescence (Bailet et al., 2009).

Les kératinocytes expriment d'importants niveaux de SYK, leur implication étant probablement due aux multiples immunorécepteurs présents dans ce type cellulaire, clefs de la réponse immunitaire cutanée (Kobayashi et al., 2009; McInturff et al., 2005). Les kératinocytes subissent un processus de différenciation poussé, le stade terminal étant la mort cellulaire, mais dont l'évolution fait intervenir de nombreux mécanismes immunitaires (Elias, 2005; Nestle et al., 2009). Il a été démontré que SYK agissait comme un immunorégulateur dans la régulation de la différenciation kératinocytaire, son expression diminuant au fur et à mesure de la différenciation (Wu et al., 2016). L'inhibition ou extinction de SYK dans les kératinocytes peut même augmenter l'expression des marqueurs de différenciation, suggérant que SYK inhibe la différenciation kératinocytaire.

De manière générale, l'expression de SYK dans la peau semble également pouvoir médier la réponse aux UVs, régulant la sécrétion de MMPs (MMP-1 et MMP-13) dans le stroma cutané et produisant un signal pro-survie avec activation de la voie JNK (Papazoglou et al., 2011).

D. Les pathologies cancéreuses

1. SYK, promoteur de tumeur

Figure 27 : Cancers dans lesquels SYK est promoteur de tumeur

D'après (Krisenko and Geahlen, 2015)

Type de cancer	Observations	Références
Leucémie lymphoblastique B (LLC-B)	Activation constitutive de SYK. L'inhibition de SYK induit l'apoptose.	(Buchner et al., 2009; Chen et al., 2008a; Gobessi et al., 2009)
Lymphome diffus à larges cellules B (DLBCL)	Activation constitutive de SYK, augmentation du nombre de copie du gène. L'inhibition de SYK induit l'apoptose ou l'arrêt de cycle.	(Chen et al., 2008b; Chen et al., 2013; Cheng et al., 2011)
Lymphome folliculaire (LF)	L'inhibition de SYK induit l'apoptose.	(Leseux et al., 2006)
Lymphome de la cellule du manteau (LCM)	Surexpression de SYK suite à l'amplification du gène. L'inhibition de SYK induit l'apoptose.	(Rinaldi et al., 2006)
Lymphome de la zone marginale (LZM)	Augmentation de l'expression de SYK.	(Ruiz-Ballesteros et al., 2005)
Leucémie lymphoblastique aigüe B (LLA-B)	Activation constitutive de SYK. Les inhibiteurs de SYK bloquent la prolifération tumorale.	(Perova et al., 2014; Uckun et al., 2010a; Uckun et al., 2013)
Lymphome des cellules T périphériques (PTCL)	Activation constitutive de SYK. Protéine de fusion TEL-SYK.	(Feldman et al., 2008; Pechloff et al., 2010)
Virus Epstein-Barr + désordre lymphoprolifératif (PTLD)	Activation de SYK par LMP2A. L'inhibition de SYK induit l'apoptose.	(Hatton et al., 2011)
Leucémie aigüe myéloïde (LAM)	Activation de SYK par les intégrines. L'inhibition de SYK diminue la prolifération et induit la différenciation.	(Hahn et al., 2009; Miller et al., 2013; Oellerich et al., 2013)
Carcinome nasopharyngien	Activation de SYK par LMP2A.	(Bach et al., 2014)
Cancer du sein HER2 positif	Activation de SYK par C35.	(Lu et al., 2006)
Cancer du pancréas	Cellules dépendantes de K-RAS. Supprimer SYK induit l'apoptose.	(Fotheringham et al., 2012)
Cancer du poumon	Cellules dépendantes de K-RAS. Supprimer SYK induit l'apoptose.	(Fotheringham et al., 2012)

Rétinoblastome	Expression de SYK dans les cellules tumorales, absent du tissu normal. L'inhibition de SYK induit l'apoptose.	(Singh et al., 2009)
Cancer de l'ovaire	L'expression de SYK augmente avec la progression tumoral. L'inhibition de SYK induit l'apoptose.	(Lowe et al., 2004)
Cancer de poumon à petites cellules (SCLC)	Forte expression de SYK dans les tumeurs. L'extinction de SYK induit l'apoptose.	(Prinos et al., 2011; Zhang et al., 2012b)
Carcinome squameux de la tête et du cou (SCCHN)	La forte expression de SYK stimule la motilité cellulaire.	(Udyavar et al., 2013)

a. La survie dans les cancers hématopoïétiques sous le BCR

Le rôle de SYK en tant que promoteur de la prolifération cellulaire tumorale est particulièrement décrit dans les pathologies des cellules B, SYK étant fortement impliquée dans la signalisation du BCR et la survie cellulaire.

Au cours du développement des cellules B dans la moelle osseuse, le réarrangement de la chaîne lourde des immunoglobulines aboutit à un récepteur de pré-cellules B contenant une chaîne lourde, une chaîne légère de substitution et un hétérodimère CD79a/CD79b; porteurs de motifs ITAM (Monroe, 2006). Un réarrangement génétique et un assemblage du récepteur sont requis pour que les cellules survivent à la transition de cellules progénitrices en pré-cellules B, via une signalisation issue du pré-BCR relayée par SYK. En conséquence, les précurseurs des cellules B déficientes pour SYK échouent généralement à se différencier en pré-cellules B (Turner et al., 1995). Celles qui réussissent la transition le font principalement grâce à la faible expression constitutive de ZAP-70, mais échouent à progresser plus loin, et n'aboutissent jamais en cellules B matures (Fallah-Arani et al., 2008). Cette transition plus tardive requiert le réarrangement du locus de la chaîne légère, la production et l'expression à la surface du récepteur de cellule B mature, celui-ci étant également associé avec l'hétérodimère CD79a/CD79b. A ce stade, SYK est à nouveau requis pour la survie cellulaire, supposément activé par la signalisation tonique (en l'absence d'antigènes) du BCR (Monroe, 2006). En fait, l'expression soutenue du BCR et sa signalisation tonique sont requises pour la survie continue des cellules B matures (Lam et al., 1997). La signalisation via le récepteur BAFF, un récepteur au TNF requis pour la survie des cellules B folliculaires, passe également par l'association de SYK aux motifs ITAM du BCR pour assurer la survie cellulaire (Schweighoffer et al., 2013).

Il a été montré dans un modèle murin de lymphome non-hodgkinien, portant une association de l'oncogène c-Myc inducible par immunoglobulines (E μ -MYC) et un BCR spécifique au HEL (Hen Egg Lysosome), (BCR^{HEL}), que le développement de tumeurs lymphoïdes dépend de la signalisation tonique du BCR pour assurer leur survie (Young et al., 2009). De plus, la génération de souris E μ -MYC/BCR^{HEL}/sHEL résulte en l'apparition de tumeurs plus agressives, chroniquement activées via le BCR, et ressemblant au lymphome de Burkitt. Ceci supporte le concept d'un BCR contribuant à la tumorigenèse via une signalisation tonique et/ou chronique. Dans ces deux types de tumeurs, l'extinction de SYK induit l'apoptose des cellules et inhibe la formation de tumeurs chez la souris.

Un autre exemple du rôle primordial de SYK et du BCR est leur implication dans la tumorigenèse de la LLC-B (leucémie lymphoblastique B). La LLC-B émerge de l'expansion clonale de cellules B matures, les cellules de LLC-B étant typiquement BCR positives et formant deux catégories générales : une forme indolente avec les gènes de la région variable de la chaîne lourde des immunoglobulines (IgV_H) mutés et une forme agressive avec les gènes IgV_H non mutés et exprimant ZAP-70 (Kipps, 2003). ZAP-70 n'est pas exprimée normalement dans les cellules B, et sa capacité à induire la tumorigenèse des LLC-B ne requiert pas qu'elle soit catalytiquement active, suggérant une fonction adaptatrice de la kinase (Chen et al., 2008a). Les cellules des deux classes de LLC-B sont caractérisées par la présence de hauts niveaux de SYK constitutionnellement activée (Baudot et al., 2009). Mais le fait de savoir si l'activation de SYK suit l'engagement du BCR par un antigène quelconque via une signalisation chronique ou si elle est due à une signalisation tonique du BCR indépendante de tout ligand n'est pas encore clair, les deux mécanismes pouvant induire un développement tumoral (Rickert, 2013).

L'inhibition de SYK ou son extinction, aussi bien dans la forme indolente qu'active des LLC-B, provoque l'apoptose par la voie de la caspase 3 (Baudot et al., 2009; Buchner et al., 2009; Gobessi et al., 2009). La forme agressive non mutée est particulièrement dépendante de l'activité de SYK pour sa survie (Buchner et al., 2009). Dans un essai de phase 1/2 testant l'inhibiteur de SYK fostamatinib, 55% des patients atteints de LLC-B ont répondu positivement à la thérapie (Friedberg et al., 2010). Les cellules issues de patients traités présentaient une expression diminuée de NF- κ B et des gènes cibles de c-Myc, une activation réduite de BTK (située en aval de SYK), des niveaux bas de MYC et JunB, et une diminution de l'expression des marqueurs d'activation de surface; tout ceci étant cohérent suite à une inhibition de la signalisation BCR (Herman et al., 2013).

La signalisation dépendante du BCR est également impliquée dans les LDGCB (Lymphome diffus à grandes cellules B). Le LDGCB est une collection hétérogène de pathologies, dont une partie est BCR positive, présentant une signature d'expression génique cohérente avec des cellules B

activées aux anti-IgM et reposant pour leur survie de l'expression des composants du BCR (Davis et al., 2010). De nombreuses lignées issues de LDGCB présentent une signalisation tonique ou chronique du BCR, résultant en la phosphorylation constitutive de SYK sur les tyrosines d'auto-activation (Chen et al., 2008b). Sur 61 échantillons de LDGCB de patients, 44% présentaient des niveaux élevés de SYK phosphorylée, localisés à la membrane plasmique, où le BCR se situe également (Cheng et al., 2011). Certains LDGCB primaires montrent une augmentation du nombre de copies du gène SYK, corrélée à l'augmentation de l'expression de la protéine (Chen et al., 2013). Les cellules de LDGCB dépendantes du BCR surexpriment fréquemment l'inhibiteur de la transcription BCL6, qui diminue l'expression de PTPROt, un récepteur de type phosphatase de tyrosine et régulant négativement la signalisation dépendante de SYK du BCR (Juszczynski et al., 2009). Ainsi, une diminution de PTPROt augmente la signalisation tonique du BCR (Chen et al., 2006). L'inhibition de l'activité de SYK par les inhibiteurs pharmacologiques R406 et PRT318 a un effet cytotoxique et cytostatique sur la plupart des LDGCB BCR positives (Chen et al., 2008b; Cheng et al., 2011), tandis que l'extinction de SYK par interférence à ARN provoque un arrêt de cycle dans les lignées de LDGCB sensibles au PRT318, mimant les effets de l'inhibiteur (Cheng et al., 2011). De manière cohérente avec ces observations, 22% des patients de LDGCB ont été répondeurs lors des essais cliniques du fostamatinib (Friedberg et al., 2010).

L'activation constitutive de SYK a également été rapportée dans d'autres pathologies cancéreuses dérivées des cellules B, comme le lymphome folliculaire (LF) (Leseux et al., 2006), le lymphome à cellules du manteau (LCM) (Rinaldi et al., 2006) et le lymphome de la zone marginale (LZM) (Ruiz-Ballesteros et al., 2005). Les cellules de LF sont hyper-répondantes à l'engagement du BCR, comparées aux cellules B non-cancéreuses infiltrant les tumeurs (Irish et al., 2006). Dans les LCM, une rare mais létale forme de lymphome non-hodgkinien, SYK est surexprimée suite à une amplification génique, aussi bien dans les tumeurs primaires que dans les lignées (Rinaldi et al., 2006). Dans les LZM de la rate, l'expression de SYK est augmentée (Ruiz-Ballesteros et al., 2005), potentiellement en raison d'une diminution des microARNs miR-27b and miR-377, qui sont prédits comme capables de moduler la transcription du gène SYK (Arribas et al., 2013). De plus, dans les LF comme dans les LCM, le piceatannol, un inhibiteur de SYK, est toxique pour les cellules exprimant une forme constitutionnellement phosphorylée et active de SYK.

Nous pouvons donc conclure que SYK est clairement important dans la transmission de la signalisation tonique et chronique du BCR, supportant la survie cellulaire de nombreux lymphomes dérivés des cellules B.

b. La survie dans les cancers hématopoïétiques via la voie PI3K/AKT

Figure 28 : SYK et la voie PI3K/AKT

Une caractéristique fondamentale des cellules cancéreuses est leur résistance à l'apoptose (Hanahan and Weinberg, 2011), une capacité favorisée par l'expression de SYK. Ainsi, SYK est proposée comme un promoteur de la tumorigenèse dans de nombreux cancers, via la voie pro-survie PI3K-AKT.

Dans les cellules B normales, SYK couple les récepteurs aux antigènes à l'activation de la voie PI3K-AKT (Beitz et al., 1999; Vivanco and Sawyers, 2002); voie essentielle dans la signalisation du BCR dont l'activation tonique entretient une survie SYK dépendante. En cas de perte du BCR, la survie peut être assurée par l'activation constitutive de PI3K, ou la délétion de PTEN (Srinivasan et al., 2009). AKT est une kinase qui contrôle la survie via la phosphorylation de nombreux substrats pro ou anti-apoptotiques.

Une des cibles pro-survies dans les LLC-B est MCL-1, un membre de la famille BCL-2 (Youle and Strasser, 2008). L'extinction de MCL-1 par interférence à ARN mène à la mort cellulaire, en faisant un composant essentiel de la survie (Longo et al., 2008). Les LLC-B ont généralement une augmentation de la phosphorylation basale d'AKT dépendante de SYK. AKT activée phosphoryle et inhibe GSK3, qui régule négativement la stabilisation de MCL-1 par phosphorylation de sa sérine 159, menant à son ubiquitination et sa destruction par le protéasome (Inuzuka et al., 2011). PKC δ est également une cible de SYK dans les LLC-B (Baudot et al., 2009), son activation favorisant l'activation d'AKT, et peut aussi indépendamment inactiver GSK3 et stabiliser MCL-1. Ceci établit un mécanisme alternatif dans la régulation de MCL-1 indépendamment d'AKT. Ainsi, le traitement avec des inhibiteurs de SYK mène à la diminution de MCL-1, par déstabilisation de la protéine via l'inhibition de GSK3 par AKT et/ou PKC δ . L'expression de SYK protège aussi MCL-1 de la dégradation dans le rétinoblastome (Zhang et al., 2012b), suggérant que ce mécanisme doit se retrouver dans de nombreux types de tumeurs.

Dans la signalisation de PI3K/AKT se trouve mTOR, une sérine/thréonine kinase et un régulateur de la croissance tumorale (Mamane et al., 2006). Dans les AML, l'inhibition ou extinction de SYK éteint l'activité de mTOR, qui est constitutivement actif dans les cellules non traitées

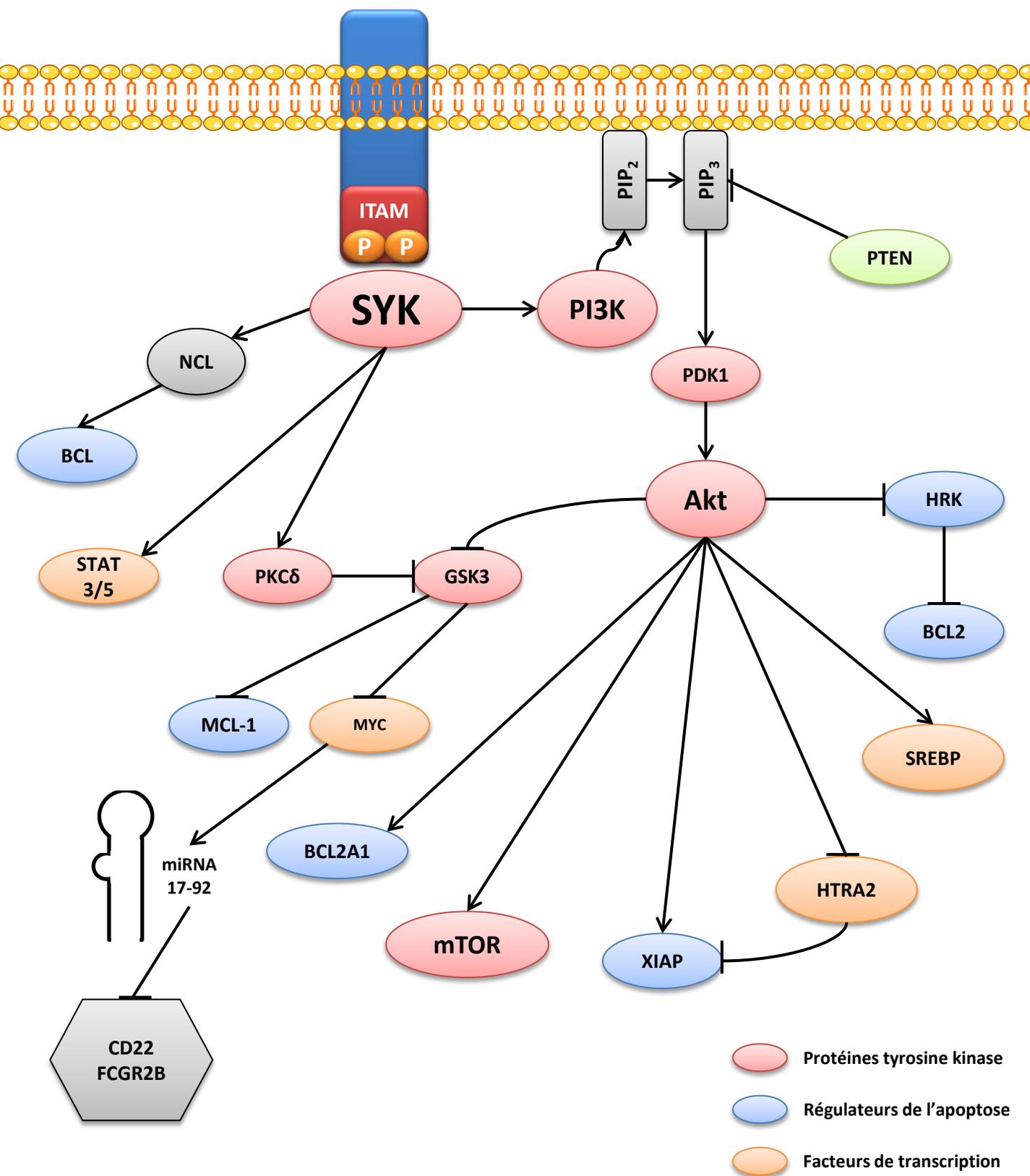


Figure 28 : SYK et la voie PI3K/AKT

Adaptée de Krisenko et al., 2016

(Carnevale et al., 2013). La combinaison d'inhibiteurs de SYK et de PI3K ou mTOR induit la différenciation des cellules d'AML.

La voie de signalisation PI3K/AKT peut également renforcer la signalisation du BCR dans certains types de tumeurs. Dans les DLBCL, l'activation de SYK et PI3K/AKT par le BCR active à son tour le facteur de transcription SREBP, un régulateur de la synthèse du cholestérol (Chen et al., 2013). Ceci a pour résultat l'augmentation d'expression des enzymes de la voie anabolique du cholestérol, ce qui augmente la concentration de cholestérol à la membrane plasmique, stimulant le BCR par son agrégation dans les domaines lipidiques membranaires.

De plus, l'activation d'AKT dépendante de SYK et l'inhibition consécutive de GSK3 mène à l'accumulation de MYC, normalement dégradé après sa phosphorylation par GSK3. MYC active le groupe miR17-92, qui stimule le BCR en régulant l'expression de protéines inhibitrices comme CD22 et FcγRIIb (Psathas et al., 2013). Ces deux protéines portent des motifs ITIMs (immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif), qui lors de leurs phosphorylations lient des régulateurs négatifs de la signalisation BCR, comme la phosphatase de lipide SHIP1 et la phosphatase de tyrosine SHP-1 (Nitschke, 2005). Ainsi, aussi bien l'augmentation d'expression de MYC que des miR17-92 réduisent l'expression des protéines à motif ITIM pour promouvoir l'activation par le BCR de la signalisation en aval, SYK, PI3K et AKT incluses.

c. La survie dans les cancers hématopoïétiques indépendants du BCR

Le rôle oncogénique de SYK supportant la croissance tumorale n'est pas restreint aux cellules exprimant le BCR. Dans les LLA-B (leucémies lymphoblastique aigüe B), la plupart des cellules malignes dérivent des précurseurs des cellules B, et sont donc privées des complexes types pré-BCR et BCR. Cependant, ces cellules tumorales survivent et développent de nombreuses caractéristiques des pré-cellules B, même en l'absence du pré-BCR (Perova et al., 2014). De manière intéressante, la plupart des cellules de LLA-B, principalement isolées de patients, ont des niveaux élevés de SYK constitutivement phosphorylée et activée; leur croissance *in vitro* et en xénogreffes étant atténuée par les inhibiteurs de SYK (Perova et al., 2014; Uckun et al., 2010a; Uckun et al., 2013).

L'expression de SYK peut également être détectée dans 94% des lymphomes T périphériques (PTCL) sous une forme constitutivement phosphorylée (Feldman et al., 2008). Le signal en amont de SYK augmentant l'activité des LLA-B et PTCL reste à être identifié, même si le TCR est un suspect dans le cas des PTCL (Warner et al., 2013)

Dans certains cancers lymphoblastiques, les protéines porteuses de motifs ITAM en dehors du BCR supportent l'activation de SYK pour induire la survie tumorale. Durant la phase latente de l'infection au virus d'Epstein-Barr (EBV), la protéine LMP2A est exprimée à la membrane (Merchant et al., 2000). LMP2A interagit avec LYN et SYK, le second via un ITAM en N-terminal qui, lorsqu'il est phosphorylé, s'associe avec les domaines SH2 de SYK. Cette interaction inhibe la signalisation du BCR et prévient la lyse cellulaire. De manière intéressante, LMP2A se substitue au BCR pour promouvoir la différenciation des cellules B, même en l'absence des immunoglobulines de surface, en produisant le signal tonique nécessaire à la survie des cellules B (Caldwell et al., 1998). Ainsi, les cellules B exprimant LMP2A peuvent coloniser les organes lymphoïdes. L'infection par l'EBV est quasi-universelle chez l'adulte, l'infection étant contrôlée par une réponse T cytotoxique. Cependant, chez des individus immuno-déprimés, il peut survenir un désordre lympho-prolifératif (PTLD). Les cellules de lymphomes en résultant sont principalement dérivées des cellules B et sont caractérisées par l'activation constitutive de SYK (Hatton et al., 2011); ces cellules étant dépendantes de cette expression activée de SYK, son inhibition par le R406 et son extinction par interférence à ARN induisant l'apoptose.

Dans la leucémie myéloïde aigüe (LAM), les intégrines peuvent fonctionner en amont de SYK pour favoriser son activité et supporter le croissance tumorale. Les LAM émergent de l'augmentation de la prolifération et du défaut de différenciation des cellules progénitrices du lignage myéloïde, n'exprimant donc pas le BCR. Une étude sur la sensibilité des LAM aux inhibiteurs de l'EGFR couplée à un crible par interférence ARN a identifié SYK comme un acteur majeur de la pathogénèse des LAM (Hahn et al., 2009). Le ciblage de SYK par inhibiteur ou interférence ARN est capable de diminuer la prolifération et d'induire la différenciation des cellules primaires de LAM et des lignées cellulaires, inhibant même la croissance de xénogreffes chez la souris (Hahn et al., 2009). L'intégrine $\beta 3$ a ainsi pu être identifiée pour son rôle clef dans la prolifération et différenciation des LAM (Miller et al., 2013), sa suppression par interférence ARN réduisant la phosphorylation et l'activité de SYK similairement à l'effet des inhibiteurs de SYK sur les LAM. D'autres acteurs identifiés par spectrométrie comme des partenaires clefs de SYK dans les LAM ont été découverts : l'intégrine $\beta 2$ et Fc γ RI (Oellerich et al., 2013). L'engagement de l'un ou l'autre de ces récepteurs est couplé à l'activation de SYK. Le KO de l'intégrine $\beta 2$, ou de la chaîne de Fc γ R, diminuent la prolifération SYK-dépendante des lignées de LAM. De plus, dans les neutrophiles et les macrophages, l'activation de SYK par les intégrines requiert l'expression de DAP12 ou de Fc γ R (Mocsai et al., 2006); les deux arborant des motifs ITAM qui, lors de leur phosphorylation, s'associent avec SYK. Fc γ R étant constitutivement phosphorylé sur son motif ITAM et associé à SYK dans les LAM, il est suspecté d'avoir un rôle d'activation tonique de SYK (Oellerich et al., 2013). Enfin, approximativement 1/3 des

patients de LAM portent des mutations du gène *FLT3*, résultant à l'expression constitutivement active de cette RTK. Dans ces cellules, *FLT3* s'associe à *SYK* via son domaine C-SH2, aboutissant à l'hyper-activation des deux interactants et activant la voie *MYC* (Puissant et al., 2014).

Dans de nombreux types cellulaires comme les DLBCL, le lymphome de Burkitt et le carcinome mammaire, *SYK* interagit avec *NCL* (nucléoline), induisant la liaison de *NCL* au messenger codant pour la protéine anti-apoptotique *BCL-XL* (Wang et al., 2014). Ceci permet de stabiliser le messenger de *BCL-XL* face à la dégradation induite par les stress oxydatifs et génotoxiques.

SYK influence aussi l'activité des protéines *STAT* (signal transducer and activator of transcription), des facteurs de transcription activés via leur phosphorylation sur tyrosine. Dans cette famille, *STAT3* et *STAT5*, en particulier, sont des régulateurs centraux de la survie tumorale (Yu and Jove, 2004). L'analyse protéomique des interactants de *SYK* dans les AML identifie *STAT3* et *STAT5* comme des partenaires directs de *SYK* (Oellerich et al., 2013). Les deux sont constitutivement activés et phosphorylés dans les AML par la signalisation tonique, l'activation de *SYK* étant effectuée par les intégrines et *FcRγ*. L'expression constitutivement activée de *STAT3* et *STAT5* protège les cellules d'AML des effets anti-prolifératifs des inhibiteurs de *SYK*.

d. Les fusions de SYK

Une voie alternative pouvant générer toniquement un signal *SYK* indépendant passe par un réarrangement du gène et la production d'une fusion de protéines constitutivement actives. Cependant, grâce aux actuels "big datas", il a été établi que *SYK* est très rarement muté dans les cancers (Gao et al., 2013), indiquant que *SYK* ne semble pas être un inducteur majeur de la tumorigenèse. Cependant, des translocations chromosomiques impliquant le gène *SYK* ont été détectées comme pouvant produire des protéines de fusion promouvant les pathologies myéloprolifératives ou lymphoprolifératives.

Par exemple, lors de la fusion du domaine de dimérisation du gène *TEL* avec *SYK*, le produit de fusion donne une kinase active provoquant une maladie myéloproliférative (Kuno et al., 2001). Cette activation de *SYK* mime probablement ce qui se passe lors de l'agrégation de récepteurs couplés à *SYK*, stimulant son autophosphorylation et modulant son activité (Geahlen, 2009). L'expression de la protéine de fusion *TEL-SYK* dans les AML provoque la phosphorylation de *STAT5* (Kanie et al., 2004), alors que *STAT3* est phosphorylée dans les LLC-B et les LLA-B par une voie dépendante de *SYK* (Buchner et al., 2009; Uckun et al., 2010b). De manière intéressante, cette activation des *STATs* survient indépendamment de la voie *JAK*, le régulateur canonique en amont de l'activité de *STAT*.

Nous pouvons également relever la fusion de SYK avec la tyrosine ITK : la région N-terminale contenant les domaines Tec et PH d'ITK étant fusionnée à l'inter-domaine B et au domaine catalytique de SYK . Cette fusion est fréquemment trouvée dans les PTCL, formant une protéine constitutivement active et dont l'expression mène à la phosphorylation d'adaptateurs et de protéines en aval (Dierks et al., 2010; Pechloff et al., 2010). La fusion ITK-SYK provoque des maladies lymphoprolifératives des cellules T.

L'expression d'aucune de ces fusions n'est probablement suffisante pour provoquer la transformation des cellules B ou T : d'autres altérations génétiques doivent s'ajouter à ce contexte mutationnel (Hug et al., 2014).

e. Signalisation ITAM dans les cancers non hématopoïétiques

L'activation inappropriée de SYK par des protéines portant des motifs ITAM peut contribuer à la transformation tumorale dans les cellules non hématopoïétiques.

Par exemple, le virus de la tumeur mammaire murine, causant des adénocarcinomes chez la souris, exprime le gène *env* qui, lors de son expression dans l'épithélium mammaire, provoque des changements morphologiques proches d'une transformation tumorale (Katz et al., 2005). La protéine *env* contient un motif ITAM pouvant s'associer à SYK. Le blocage de la transformation des cellules épithéliales par le piceatannol, un inhibiteur de SYK, est un argument qui montre le rôle oncogénique de SYK dans cet exemple.

Le motif ITAM porté par LMP2A, qui contribue à la survie tumorale dans les PTLD, influence les propriétés physiques des carcinomes nasopharyngiens induits par l'EBV (Lu et al., 2006). LMP2A s'associe à SYK via son ITAM et augmente la motilité cellulaire de manière dépendante de la phosphorylation de l'ITAM et des expressions et activités de SYK. L'expression ectopique de LMP2A dans les kératinocytes augmentent également la migration cellulaire dépendamment de la liaison ITAM-SYK et induit la translocation de l'intégrine αV à la membrane (Fotheringham et al., 2012).

Le gène codant pour C35 (C17orf37), situé sur l'amplicon *HER2*, voit son expression augmentée avec l'amplification du gène *HER2* dans le cancer du sein humain (Katz et al., 2010). C35 porte un motif ITAM et son expression dans l'épithélium mammaire induit une prolifération invasive et déclenche une transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) caractérisée par la perte de la cadhérine E. Cette activité est dépendante du motif ITAM de C35 et de SYK.

Il est intéressant de noter que, dans les même types cellulaires que ceux évoqués plus haut, l'expression de SYK en absence d'un effecteur portant un motif ITAM tel ENV, LMP2A ou C35 provoque l'inhibition de la motilité cellulaire et de l'EMT. Ainsi, ces molécules à l'expression

aberrante contenant des motifs ITAM doivent séquestrer SYK loin de ses partenaires protéiques normaux et la rapprocher de substrats dont la phosphorylation altère la prolifération et la migration cellulaire.

f. La survie cellulaire dans les cancers non hématopoïétiques

Les mutations oncogéniques de K-Ras sont fréquemment vues dans les adénocarcinomes du pancréas, du poumon et du colon. Une analyse compare, via leurs signatures d'expression, des cellules issues de tumeurs pancréatiques et pulmonaires dépendantes de l'expression oncogénique de K-Ras pour leur survie, avec des cellules tumorales non dépendantes de K-Ras (Singh et al., 2009). De manière intéressante, *SYK* est le gène le plus communément exprimé dans les cellules dépendantes de K-Ras alors que son expression est absente dans les cellules indépendantes de K-Ras. Dans les cellules K-Ras dépendantes, l'inhibition et la suppression de SYK mène à la mort cellulaire via une activation de la caspase 3. Inversement, dans de nombreuses cellules, la seule expression d'un oncogène comme K-Ras induit l'apoptose; à moins que les cellules acquièrent d'autres modifications anti-apoptotiques (Lowe et al., 2004). Il est donc probable que l'activité pro-survie de SYK protège les cellules de l'apoptose induite par l'oncogène K-Ras.

SYK a un rôle pro-survie similaire dans le rétinoblastome (Zhang et al., 2012b). Le séquençage du génome entier de cellules de rétinoblastome ne révèle pas de mutations significatives d'oncogènes ou de suppresseurs de tumeur autres que *RB1*. Cependant, de nombreuses modifications de méthylation épigénétiques sont observées, comme la diminution de la méthylation du promoteur du gène *SYK*. En conséquence, SYK est exprimée dans les cellules primaires et de lignées de rétinoblastome mais est absente des cellules normales de la rétine. L'inhibition et l'extinction de SYK dans ces cellules tumorales provoquent une apoptose via les mitochondries. L'utilisation d'inhibiteur de SYK dans les chimiothérapies contre le rétinoblastome améliore l'efficacité du traitement dans le modèle murin de la pathologie, faisant de SYK une cible thérapeutique prometteuse pour le traitement du rétinoblastome infantile (Zhang et al., 2012b).

Dans de nombreux tissus, incluant le cerveau, le colon, le rein et l'ovaire, les niveaux de l'ARN messager de SYK sont, en général, supérieurs dans les cancers par rapport aux tissus normaux (Shin et al., 2011); suggérant des rôles potentiels de SYK dans la tumorigenèse de nombreux types cellulaires en dehors du système immunitaire.

Dans le cancer de l'ovaire par exemple, l'expression de SYK augmente avec chaque stade de développement tumoral (Prinos et al., 2011) : les tumeurs faiblement agressives ont de plus faibles niveaux de SYK, les tumeurs de grade 1 montrent des niveaux d'expression intermédiaires, son

expression étant la plus haute dans les tumeurs très agressives de grade 3. L'extinction de SYK inhibe la croissance dépendante de l'adhésion et provoque l'apoptose des cellules tumorales ovariennes surexprimant SYK.

L'analyse des gènes co-exprimés dans le cancer du poumon à petites cellules (SCLC) révèle SYK comme un potentiel oncogène "driver" (Udyavar et al., 2013). L'examen de tumeurs primaires de SCLC révèle une expression supérieure de SYK dans 30% des échantillons par rapport à l'épithélium alvéolaire normal. De même, une grande majorité de lignées de SCLC surexpriment le messager de SYK (Barretina et al., 2012), son extinction diminuant la croissance cellulaire et augmentant l'apoptose.

Enfin, SYK est fréquemment retrouvée dans les carcinomes squameux de la tête et du cou (SCHN), où son expression augmente la migration cellulaire (Luangdilok et al., 2007). Une expression élevée de SYK est corrélée avec les SCCHN au fort potentiel métastatique et avec un faible taux de survie des patients.

2. SYK, suppresseur de tumeur

Figure 29 : Cancers dans lesquels SYK est suppresseur de tumeur

D'après (Krisenko and Geahlen, 2015).

Type de cancer	Observations	Références
Leucémie aigüe lymphoblastique des cellules pro-B (Pro-LAL-B)	L'extinction de SYK provoque le cancer.	(Goodman et al., 2001)
Cancer du sein	La diminution de SYK est corrélée à l'invasion, les métastases et la progression de la tumeur. Méthylation du promoteur et perte allélique. La ré-expression de SYK inhibe la migration et les métastases. L'extinction de SYK induit l'EMT.	(Blancato et al., 2014; Coopman et al., 2000; Layton et al., 2009; Moroni et al., 2004; Sung et al., 2009; Toyama et al., 2003).
Adénocarcinome pancréatique canalaire (PDAC)	Perte de SYK dans les cellules tumorales faiblement différenciées. L'extinction de SYK induit l'EMT.	(Layton et al., 2009)
Cancer de la vessie	Expression de SYK diminuée, extinction épigénétique.	(Kunze et al., 2006)
Cancer colorectal	Expression de SYK diminuée, extinction épigénétique.	(Yang et al., 2013)

	La re-expression de SYK réduit la migration et l'invasion.	
Mélanome	Expression de SYK diminuée, extinction épigénétique. La réexpression de SYK réduit la migration et l'invasion. La réexpression dans les lignées induit la sénescence.	(Bailet et al., 2009; Hoeller et al., 2005; Muthusamy et al., 2006)
Cancer gastrique	Expression de SYK diminuée, extinction épigénétique. Changement dans la localisation nucléaire.	(Nakashima et al., 2006; Wang et al., 2004)
Cancer nasopharyngien	Expression de SYK diminuée, extinction épigénétique.	(Jin et al., 2012)
Carcinome hépatocellulaire (HCC)	Expression de SYK diminuée, extinction épigénétique. Dégradation via CHK1. La re-expression de SYK réduit la migration et l'invasion. SYK-B augmente les métastases.	(Yuan et al., 2006)
Cancer de l'ovaire	SYK favorise la survie cellulaire alors que SYK-B provoque l'apoptose.	(Lowe et al., 2004)

a. La suppression tumorale dans les LAL-B

Un vaste nombre de publications indique que SYK est impliqué dans le développement tumoral des cancers du lignage hématopoïétique, son activation étant importante pour la survie et la prolifération cellulaire, avec toutefois une exception notable. L'ARN messenger de SYK subit un traitement alternatif menant à une forte réduction de son expression et de son activité dans la Leucémie Aigüe Lymphoblastique des cellules pro-B infantile CD19+ CD10-. Cet évènement provoque l'arrêt de la maturation des pro-cellules B en pré-cellules B, c'est donc un rare exemple où la perte de SYK contribue à la progression tumorale dans un cancer dérivé des cellules B (Goodman et al., 2001).

b. La suppression tumorale dans les carcinomes

Il est compliqué d'établir un rôle précis pour SYK dans les carcinomes, des cancers dérivés des cellules épithéliales. Dans certaines cellules et types de tissus, SYK est associée à un phénotype malin. Cependant, pour de nombreux types de tumeurs, SYK est exprimée dans les carcinomes bien à

modérément différenciés, mais est absente des cellules peu différenciées et invasives. Son extinction dans des tumeurs plus différenciées augmente la prolifération invasive alors que sa réexpression dans des cellules très agressives ralentit leur mobilité et inhibe la formation de métastases. Ainsi, SYK est fréquemment décrit comme un suppresseur de tumeur dans de nombreux cancers dérivés des cellules épithéliales.

Une première relation inverse entre l'expression de SYK et la progression tumorale fut décrite par l'équipe de Mueller étudiant le rôle de la kinase dans la carcinogénèse mammaire (Coopman et al., 2000). Aussi bien au niveau messager que protéique, SYK est présente dans les cellules épithéliales normales de la glande mammaire et dans les cancers du sein à faible potentiel métastatique, alors qu'elle est absente des lignées hautement invasives et métastatiques. Dans les échantillons de patients, la perte de SYK durant le développement tumorale est progressive avec des niveaux d'expression réduits dans le carcinome canalaire *in situ* (DCIS) et complètement perdue dans le cancer du sein invasif (Blancato et al., 2014; Moroni et al., 2004). Les métastases à distance sont plus fréquemment rencontrées chez les patients présentant des niveaux réduits du messager de SYK (Toyama et al., 2003).

La perte de SYK est une double conséquence de la méthylation des îlots CpG de son promoteur et de la perte allélique. Le promoteur de SYK est fréquemment hyperméthylé dans les tumeurs mammaires primaires, mais non-méthylé dans les tissus mammaires normaux adjacents (Layton et al., 2009). La perte hétérozygotique du gène SYK est fréquente dans le carcinome canalaire invasif (IDC) et dans les DCIS adjacents aux IDC (Blancato et al., 2014). En conséquence, il a été montré que des souris haplo-insuffisantes pour SYK avaient un risque accru de développer des tumeurs mammaires (Sung et al., 2009).

Une distribution asymétrique similaire de SYK entre des cellules cancéreuses peu ou bien différenciées peut être retrouvée dans de nombreux types de tumeurs. Par exemple SYK est retrouvée dans les canaux normaux du pancréas et dans les cellules bien différenciées des cancers pancréatiques, mais est perdue dans l'adénocarcinome pancréatique canalaire (PDAC), dont les cellules vont de modérément à faiblement différenciées (Layton et al., 2009). De même, SYK est présente dans les lignées de cancer stromal pancréatique (PDAC), mais est absent des lignées moins différenciées.

De manière intéressante, les cellules des cancers du pancréas et du poumon dépendantes de K-Ras (et SYK) pour leur survie ont une morphologie plus épithéliale alors que les cellules indépendantes de K-Ras et ayant perdues SYK ont une morphologie mésenchymateuse (Singh et al., 2009).

La diminution de l'expression de SYK dans les tumeurs agressives et invasives par une extinction épigénétique se retrouve également dans le cancer de la vessie (Kunze et al., 2006), le cancer colorectal (Yang et al., 2013), le cancer gastrique (Nakashima et al., 2006; Wang et al., 2004), le cancer nasopharyngien (Jin et al., 2012) et le carcinome hépatocellulaire (HCC) (Yuan et al., 2006). Dans le HCC, SYK est contrôlée au niveau protéique par CHK1, fréquemment surexprimée dans ce cancer. CHK1 phosphoryle SYK sur la Sérine 295 provoquant son ubiquitination et sa dégradation par le protéasome (Hong et al., 2012).

Les sites primaires des carcinomes ont généralement une morphologie épithéliale, avec des cellules resserrées, et sont caractérisés par l'expression de la cadhérine E sur les jonctions cellule-cellule. Le procédé par lequel les cellules tumorales quittent la tumeur primaire pour entrer dans la circulation et métastaser à distance requiert une transition vers le phénotype mésenchymateux, perdant la polarité cellulaire et gagnant en mobilité et en propriétés invasives (Kalluri and Weinberg, 2009). Cette transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) est cruciale pour l'embryogénèse et le développement des organes, mais les cellules cancéreuses utilisent ce mécanisme pour initier l'invasion et la formation de métastases. Les variations de l'expression de SYK entre les tumeurs faiblement et bien différenciées reflètent probablement les effets de la kinase sur la différenciation et les propriétés physiques cellulaires, incluant l'EMT.

L'expression de shRNA contre SYK, dans des cellules épithéliales mammaires (MCF10A) immortalisées mais non transformée, augmente la motilité cellulaire, l'invasion et la croissance sur agar mou, tout en induisant une morphologie fibroblastique caractéristique de l'EMT (Sung et al., 2009). Les changements d'expression génomique suite à l'extinction de SYK confirment la perte de gènes épithéliaux et l'augmentation d'expression de gènes caractéristiques des cellules mésenchymateuses. De même, une forme de SYK inactive pour son activité kinase exprimée dans des MCF7 agira comme un dominant négatif et augmentera la tumorigénèse dans un modèle de xénogreffe murin (Coopman et al., 2000). Des résultats comparables sont observés dans des carcinomes pancréatiques dépendant de K-Ras, où l'extinction de SYK mène à la perte de l'expression de la cadhérine E, caractéristique de l'EMT (Singh et al., 2009). De manière intéressante, SYK est incluse dans la signature génétique principale de l'EMT comme un gène réprimé en expression dans les cancers du sein subissant une EMT en réponse de multiple facteurs de transcriptions induisant l'EMT (Taube et al., 2010).

On peut donc conclure que SYK est un régulateur négatif de l'EMT, représenté par son expression différentielle entre les tumeurs faiblement et bien différenciées.

Le support qu'apporte SYK à la croissance des cellules avec un phénotype épithélial est probablement la source de ses effets antiprolifératifs lorsqu'elle est ré-exprimée dans des cellules tumorales au phénotype mésenchymateux. La réintroduction de SYK dans des carcinomes mammaires hautement invasifs réduit la motilité cellulaire (Zhang et al., 2009), la prolifération (Coopman et al., 2000), ralentit la croissance tumorale et inhibe la formation de métastases en xénogreffes chez l'animal (Coopman et al., 2000).

Des inhibitions identiques de la migration et de l'invasion sont retrouvées lorsque SYK est ré-exprimée dans des cellules l'ayant perdue issues de carcinomes hépatiques (Yuan et al., 2006), de cancers colorectaux (Yang et al., 2013), et d'adénocarcinomes pancréatiques (Layton et al., 2009).

Une analyse de l'expression génique de cellules Panc1 (lignée de cancer du pancréas), négatives pour SYK, révèle que plus de 2000 gènes voient leur expression modifiée par sa réexpression (Layton et al., 2009), incluant des gènes tel MMP2 qui sont requis pour la prolifération invasive. Ces cellules Panc1 ré-exprimant SYK développent également un phénotype plus différencié, et présentent plus d'interactions cellules-cellules (Layton et al., 2009), ce qui est cohérent avec la capacité de SYK à augmenter les interactions cellules-cellules dans les cancers du sein (Zhang et al., 2009).

L'application d'inhibiteurs de SYK entraîne des changements rapides des capacités physique des cellules cancéreuses exprimant SYK (Zhang et al., 2009). Ainsi, l'effet négatif de SYK sur la croissance tumorale est probablement une conséquence des changements d'expressions géniques dépendants de SYK mais aussi de la phosphorylation directe de régulateurs de la dynamique du cytosquelette (Krisenko et al., 2015; Larive et al., 2009). Par exemple, SYK peut catalyser la phosphorylation de protéines du cytosquelette comme l' α -tubuline, la cortactine, la cadhérine E, l' α -caténine et MAP1B (Krisenko et al., 2015; Larive et al., 2009; Maruyama et al., 1996; Peters et al., 1996; Zhang et al., 2009). SYK est également recruté au centrosome où sont situés de nombreux substrats (Xue et al., 2012; Zyss et al., 2005). C'est la capacité de SYK à augmenter l'adhésion et affecter négativement la migration et l'invasion qui explique son absence des cellules tumorales hautement agressives et qui la font qualifier de suppresseur de tumeur dans certains types de tumeurs.

Alors que les cellules de carcinomes progressent vers un phénotype de plus en plus invasif, la suppression de l'expression et de l'activité de SYK requièrent le soutien de mécanismes supplémentaires pour assurer la survie. Par exemple, de nombreux carcinomes indépendant de K-Ras sont déficients pour PTEN (Singh et al., 2009) et ont de hauts niveaux d'AKT activé, améliorant la survie cellulaire.

c. La suppression tumorale dans les mélanomes

SYK s'exprime dans les mélanocytes humains normaux et est absent de la majorité des lignées de mélanomes (Hoeller et al., 2005), l'expression de son messenger étant fortement diminuée dans les tumeurs primaires et les lignées (Muthusamy et al., 2006). Similairement au cancer du sein, la perte de l'expression de SYK est généralement due à l'hyperméthylation épigénétique de son promoteur (Yuan et al., 2001). En effet, le gène SYK possède des îlots CpG se retrouvant hyperméthylés dans la plupart des lignées de mélanomes et dans 30% des tumeurs (Liu et al., 2008; Muthusamy et al., 2006). Ainsi, en traitant les mélanomes ayant perdu SYK à la 5-aza-2'-déoxycytidine, un agent inhibant notamment les méthyltransférases de l'ADN et provoquant sa déméthylation, l'expression de SYK est restaurée (Muthusamy et al., 2006).

La réintroduction de SYK dans la lignée de mélanome MelJuso réduit fortement la prolifération, la formation de colonies *in vitro*, et la croissance tumorale de xénogreffes murines (Muthusamy et al., 2006) (Hoeller et al., 2005). Cependant cet effet antiprolifératif de SYK n'est pas retrouvé dans toutes les études (Hoeller et al., 2005). Ré-exprimer SYK dans les mélanomes permet également de diminuer l'invasion cellulaire d'une matrice de matrigel (Hoeller et al., 2005).

L'impact de la réexpression de SYK dans les cellules de mélanome a été étudié précédemment au sein du laboratoire, apportant de nombreuses précisions sur les processus touchés (Bailet et al., 2009). Il a ainsi été montré que la réintroduction de SYK par infection adénovirale dans des lignées de mélanomes négatives pour SYK permettait de réduire la formation de colonies sur plastique, la croissance tumorale en 3D (sphéroïdes) et la migration et l'invasion *in vitro* en réponse à la chimiotaxie. Ces effets sont indépendants de l'activité kinase de SYK, étant reproductibles avec un mutant invalidant son activité, suggérant un rôle d'adaptateur lié aux domaines SH2. Ces effets de la réintroduction de SYK sont les conséquences d'une modulation du cycle cellulaire et de l'entrée des cellules en sénescence (aplatissement, agrandissement, apparition de vacuoles et marquage β -Gal). Les mélanomes sont bloqués en phase G_0 - G_1 par l'induction de la voie p53 suite à l'activation de JNK. Ainsi, la réexpression de SYK provoque la phosphorylation de p53 sous une cascade MKK7/JNK qui induit en réponse l'activation de p21 puis la déphosphorylation de Rb et la répression des gènes cibles du facteur de transcription E2F1 (Cyclines A et B). La régulation des voies p53/p21 et pRb est connue pour induire l'arrêt du cycle cellulaire et l'entrée en sénescence (Chang et al., 2000; el-Deiry et al., 1993; Noda et al., 1994; Vousden and Lane, 2007), ce qui est cohérent avec les observations.

Dans le cas du cancer du sein, une fraction du SYK réintroduit est également retrouvé au niveau des centrosomes qui contrôlent la progression mitotique, ce qui a pour conséquence une division cellulaire anormale et une mort cellulaire non apoptotique semblable à une catastrophe mitotique (Zyss et al., 2005). De par la proximité entre les deux cancers, il est possible qu'un tel mécanisme soit retrouvé dans le mélanome.

Ainsi, la réexpression de SYK dans le mélanome induit la sénescence ainsi que possiblement une mort cellulaire spécifique par catastrophe mitotique. Une piste sur les mécanismes d'actions serait le contrôle négatif de SYK sur PI3K (Mahabeleshwar and Kundu, 2003), qui régule TBX2 et c-MYC (Ismail and Bateman, 2009; Zhu et al., 2008). De fait, SYK dérégulerait TBX2 et/ou c-MYC pour induire des effets pro-sénescences, l'impact négatif de la réexpression de SYK sur le messager de c-MYC ayant déjà été observé (Bailet et al., 2009).

Ces études portent surtout sur la réintroduction de SYK dans les lignées de mélanomes l'ayant perdu, qui sont largement majoritaires. Cependant, le moment de la perte de SYK et l'impact de cette perte dans la transformation du mélanocyte au mélanome restent peu connus. De plus, même dans le mélanome le rôle de SYK en tant que suppresseur de tumeur n'est peut-être pas absolu : il a été montré que dans les mélanomes porteurs de la mutation $RAC1^{P29S}$, retrouvé dans 5 à 9% des cas, plusieurs protéines voient leur expression augmenter, telle la cycline B1, PD-L1, Ets-1 et SYK (Vu et al., 2015). Cette augmentation est inversée par la suppression de l'expression de $RAC1^{P29S}$. Cette mutation induit une augmentation de la prolifération, qui n'est pas affectée par l'expression augmentée de SYK (Vu et al., 2015). Ces résultats laissent donc penser que le rôle de SYK dans le mélanome est extrêmement complexe et peut évoluer au cours de la transformation tumorale.

Figure 30 : Mécanisme de sénescence dans le mélanome

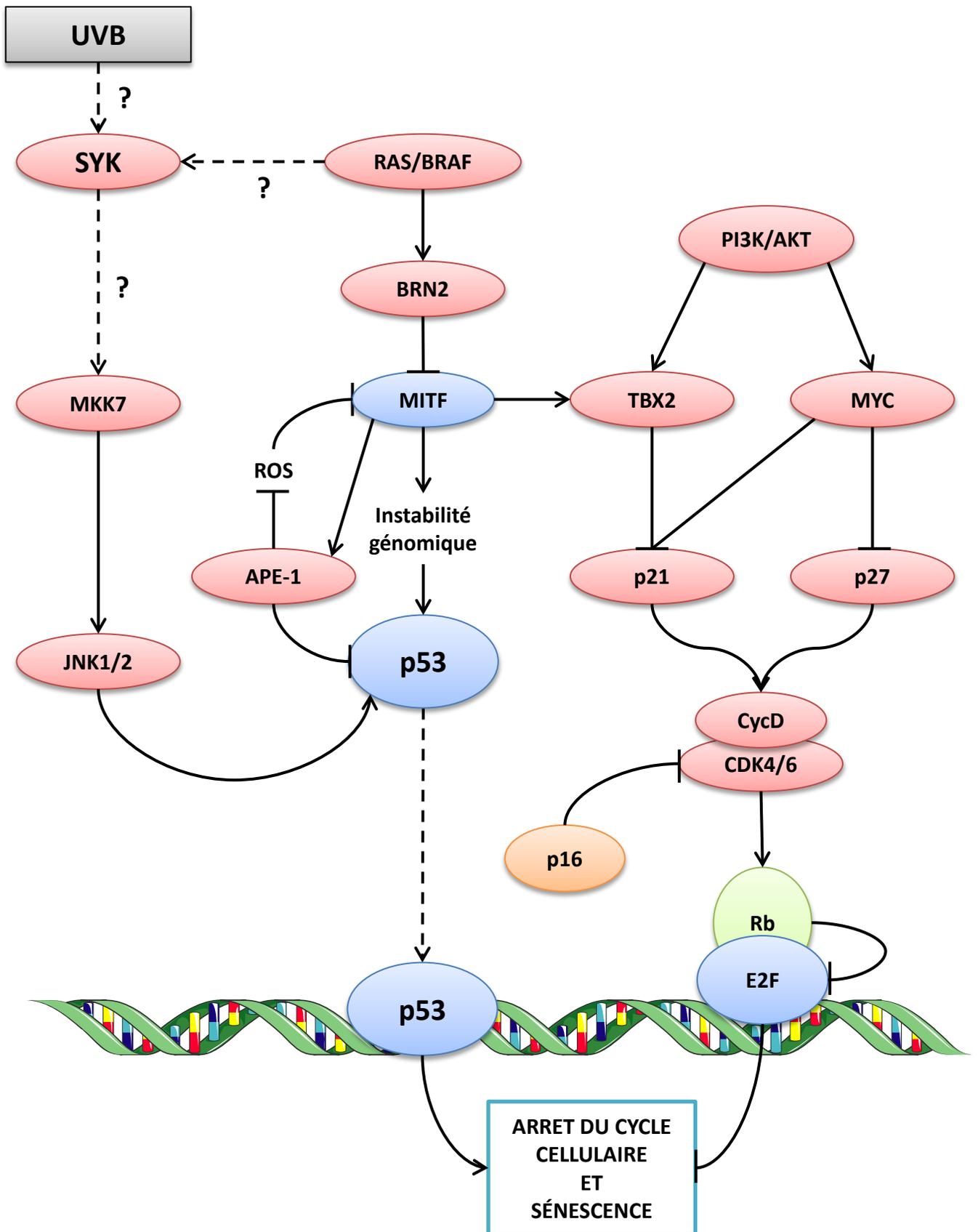


Figure 30 : Mécanisme de sénescence dans le mélanome

Adapté de Giuliano et al., 2010 et Deckert and Tartare-Deckert, 2014

IV. La voie des Intégrines

A. Généralités

1. Structure

Figure 31 : Le réseau mécanique cellulaire

Les intégrines sont des récepteurs transmembranaires qui connectent l'environnement intracellulaire à la matrice extracellulaire, via la membrane plasmique. Ainsi, les signalisations mécaniques et biochimiques transmises de ou vers le cytoplasme à la MEC sont transmises via les intégrines, faisant d'elles une clef bidirectionnelle essentielle dans la régulation de l'adhésion cellulaire.

Figure 32 : La structure des intégrines

Les intégrines sont des hétérodimères composés de deux sous-unités α et β assemblées par liaison non covalente. On recense chez les vertébrés 18 types de sous-unités α et 8 sous-unités β , pouvant s'assembler en 24 récepteurs différents ayant des affinités de liaisons et une distribution tissulaire différente (Barczyk et al., 2010; Hynes, 2002). Chaque sous-unité consiste en plusieurs larges domaines extracellulaires de liaisons aux ligands (les ecto-domaines), d'un domaine transmembranaire et d'une courte queue cytoplasmique (Gallant et al., 2005). Les tailles varient, mais les sous-unités α et β contiennent généralement autour de 1000 et 750 acides aminés, respectivement.

2. L'activation des intégrines

Figure 33 : Mécanismes d'activation des intégrines

L'activation des intégrines passe par une transition d'une forme repliée de faible affinité à une conformation étendue, de haute affinité avec la séparation de tous les domaines (à l'exception du domaine de tête). L'activation de l'intégrine éloigne le site de liaison au ligand de la membrane plasmique d'une distance de 150 à 200 Å, avec la pointe opposée à la membrane, libérant le site de liaison au ligand (Zhu et al., 2007). Les ligands des intégrines sont multiples, comportants la matrice extracellulaire (collagène, fibronectine...) et les molécules matricielles (SPARC, ostéopontine...). Elles seront détaillées plus avant dans ce chapitre.

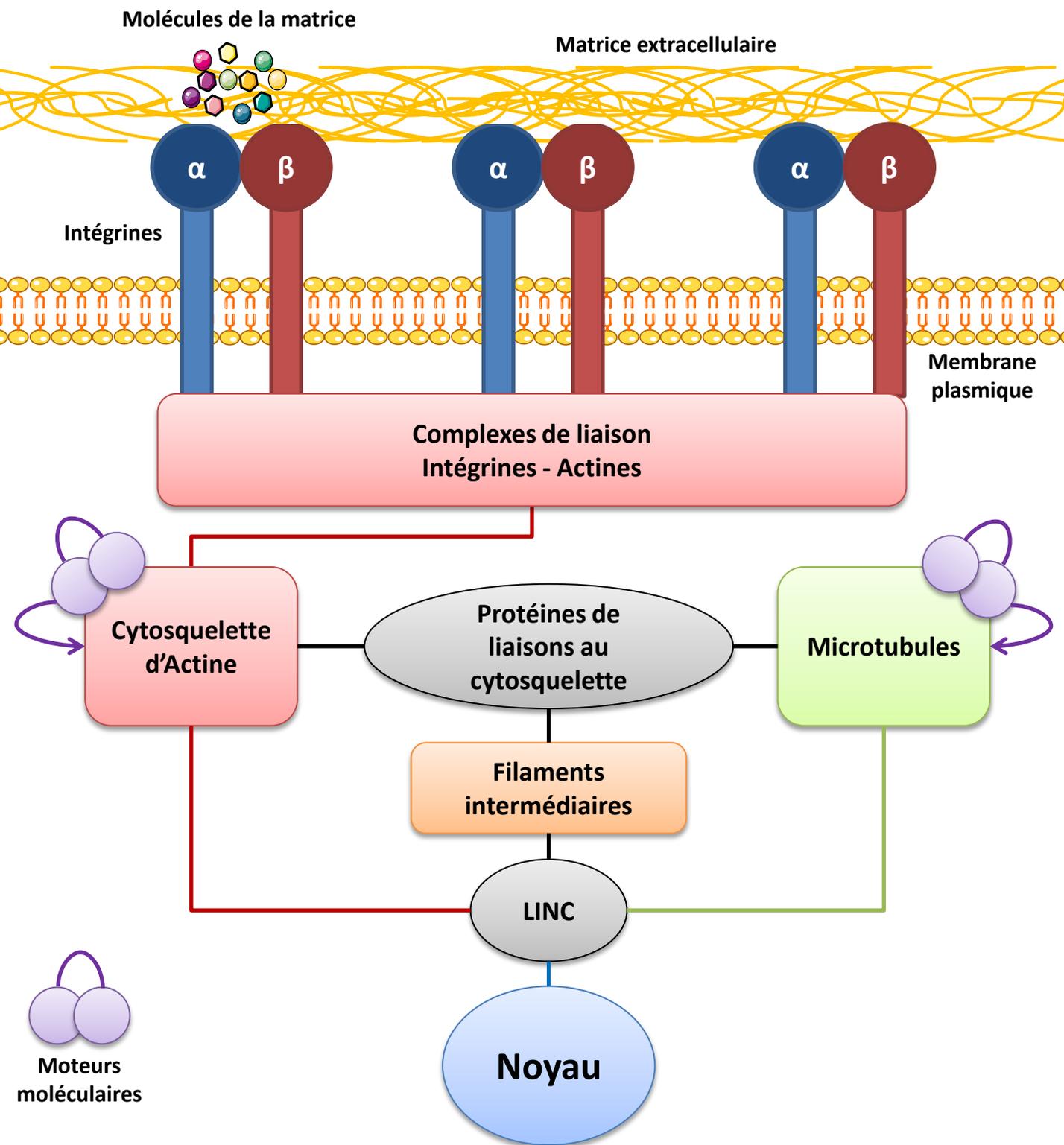


Figure 31 : Le réseau mécanique cellulaire

Adaptée de Jahed et al., 2014

La cellule est reliée mécaniquement de la matrice extracellulaire au noyau via un réseau de molécules. A l'extérieur de la cellule, les molécules de la MEC sont couplées aux récepteurs transmembranaires de type intégrines, intégrines qui sont reliées au cytosquelette d'actine directement via des molécules de liaisons. Les filaments du cytosquelette sont tous couplés entre eux via différentes protéines. Enfin, un complexe protéique nommé LINC connecte les filaments cytosquelette au nucléosquelette.

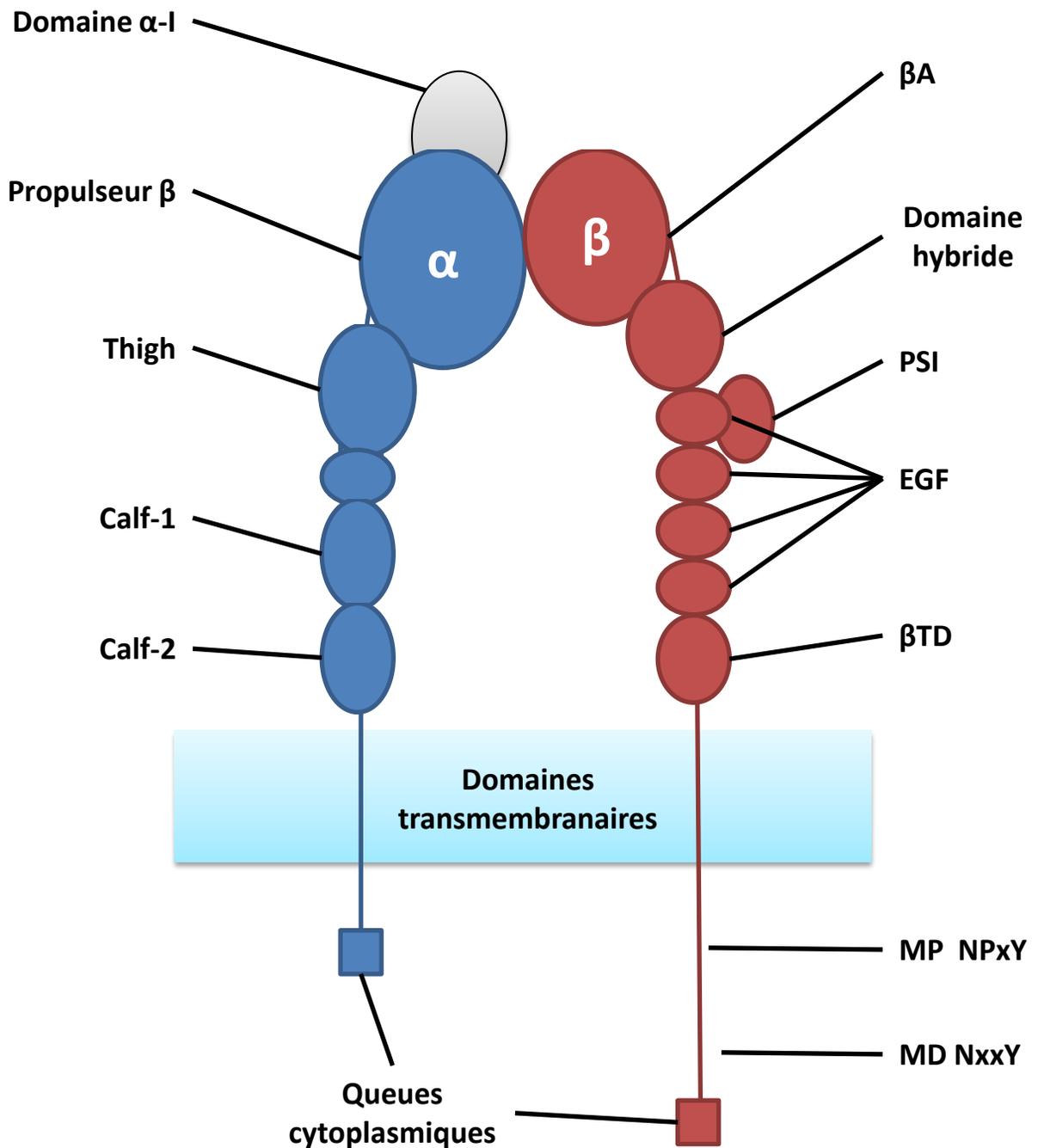


Figure 32 : La structure des intégrines

Adapté de Jahed et al., 2014

Les intégrines sont des hétérodimères composés de sous-unités α et β . La sous-unité α contient les domaines extramembranaires suivant : un propulseur β , Thigh, Calf-1 et Calf-2, ainsi que le domaine α -I présent dans 9 sous-unités α . L'ectodomaine de la sous-unité β des domaines β A, PSI (plexin-semaphoring-integrin), quatre EGFs et β TD (β -tail domain). Les deux sous-unités contiennent un domaine transmembranaire et une queue cytoplasmique. La queue cytoplasmique de la sous-unité β contient deux sites de liaisons aux phosphotyrosines (MP = Membrane-proximal, MD = membrane-distal).

De nombreuses études se sont intéressées à l'activation des intégrines au cours de la formation des adhésions focales. Il a d'abord été montré que les queues cytoplasmiques des sous-unités α et β se séparent lors de la liaison du ligand (Hughes et al., 1996). Il est établi que la rupture d'un groupe de ponts salins avec une région de résidus hydrophobes des domaines transmembranaires et cytoplasmiques des intégrines α et β est suffisant pour leur activation (Banno and Ginsberg, 2008; Kim et al., 2003; Lad et al., 2007; Moser et al., 2009).

L'activation des intégrines peut être induite par la liaison à des molécules intracellulaires : il s'agit de l'activation "inside-out" (Puklin-Faucher and Sheetz, 2009), ou être provoquée par les forces exercées par la MEC et transmises via le ligand, on parle alors d'activation "outside-in" (Takagi et al., 2002). Ces activations induisent le changement de conformation des intégrines soit du domaine de queue à celui de tête pour l'"inside-out", soit l'inverse pour l'"outside-in". Certains suggèrent que lors de l'adhésion cellulaire, le changement de conformation est induit simultanément des deux extrémités (Alon and Dustin, 2007; Puklin-Faucher et al., 2006; Puklin-Faucher and Sheetz, 2009).

Deux modèles s'essayent à décrire le mécanisme par lequel l'intégrine passe à son état de forte affinité : le cran d'arrêt et le verrou.

Le modèle du cran d'arrêt suggère que le déroulement de l'intégrine au cours de sa transition ressemble à l'ouverture d'un couteau à cran d'arrêt, avec une protéine cytoplasmique comme la taline se liant à l'intégrine et provoquant le déploiement de ses écto-domaines (Takagi and Springer, 2002; Xiao et al., 2004).

Le modèle du verrou suggère que le domaine de tête de l'intégrine et le domaine de queue β sont verrouillés par une boucle en épingle à cheveux et partagent une petite surface de 64 \AA^2 . Les mouvements mécaniques de la queue cytoplasmique et du domaine transmembranaire au cours de la signalisation "inside-out" pourraient débloquer le verrou et mener à l'activation de l'intégrine (Mehrbood and Mofrad, 2013; Xiong et al., 2003).

Ces modèles ne sont pas parfaits et comportent chacun des lacunes non élucidées.

La taline est reconnue comme un acteur majeur de l'activation "inside-out" (Wegener et al., 2007), son importance ayant été prédite par simulation et confirmée expérimentalement (Mehrbood and Mofrad, 2013). Elle active les intégrines en se liant à leur domaine NPxY de la queue cytoplasmique β . Néanmoins, tant la manière dont cette liaison peut induire le changement de conformation (par le cran d'arrêt ?) que le mécanisme de transmission de signal du domaine de queue aux écto-domaines, restent peu connus.

La liaison aux ligands de la MEC transmet des forces qui peuvent influencer sur le changement de conformation. La taline semble être la seule protéine avec un domaine de liaison aux

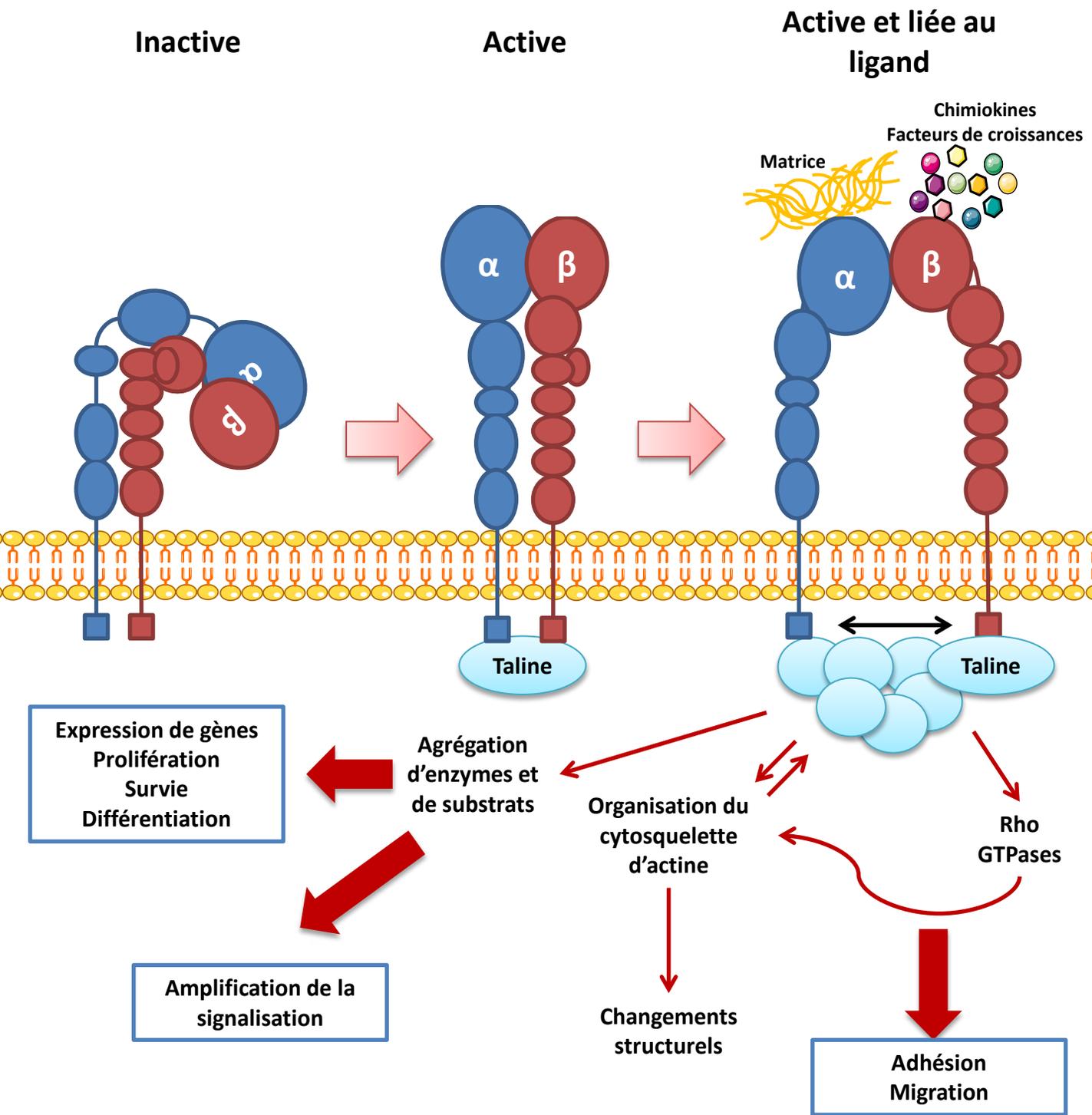


Figure 33 : Mécanisme d'activation des intégrines

Adaptée de Tharmalingam et al., 2016

phosphotyrosines (domaines PTB) qui active les intégrines en s'y liant, bien que les intégrines puissent lier à leur motif NPxY d'autres protéines cytoplasmiques possédant des PTB sans provoquer leur activation (Calderwood et al., 2003; McCleverty et al., 2007).

Outre le motif NPxY, la taline peut interagir avec d'autres régions de la queue cytoplasmique de la sous-unité β , ce qui pourrait expliquer son exclusivité dans l'activation des intégrines (Wegener et al., 2007). Mais certaines études suggèrent que la taline n'est pas le seul acteur dans l'activation des intégrines, et que la kindline agirait en coopération avec la taline à cette fin (Kahner et al., 2012; Montanez et al., 2008; Moser et al., 2008; Plow et al., 2009).

3. Le recyclage des intégrines

Figure 34 : Le recyclage des intégrines

Les intégrines font partie des récepteurs membranaires régulés par endocytose (Bridgewater et al., 2012; Caswell and Norman, 2006; De Franceschi et al., 2015; Pellinen and Ivaska, 2006). Les cycles d'endocytoses et d'exocytoses permettent le recyclage, contrôlent la disponibilité à la membrane plasmique des intégrines, et pour certaines d'entre elles leur quasi-totalité est recyclée toutes les 30 min. La dégradation des intégrines est lente (la demi-vie des intégrines de surface se situe entre 12 et 24h (Bottcher et al., 2012; Dozynkiewicz et al., 2012; Lobert et al., 2010; Tiwari et al., 2011)), ainsi la majorité des intégrines internalisées est recyclée (Pellinen and Ivaska, 2006).

Cette régulation fine de la population des intégrines de surface influence leur fonction, et des preuves indiquent que les différentes routes d'endocytoses qui contrôlent ce trafic jouent un rôle important dans la migration cellulaire, incluant l'haptotaxie, la chimiotaxie et l'invasion de matrices 3D. Les GTPases des familles RAB et ARF sont des régulateurs clefs du transit via le système endolysosomal et sont elles-mêmes contrôlées par des cycles de liaison de GTP, catalysés par les GEFs (guanine nucleotide exchange factors) et hydrolysés par les GAPs (GTPase-activating proteins). Les GTPases RAB recrutent leurs protéines effectrices pour réguler le tri, la liaison aux protéines motrices, l'attachement, l'ancrage et la fusion des vésicules (Zhen and Stenmark, 2015), alors que les ARFs sont associées au recrutement des protéines du manteau qui contrôlent le bourgeonnement des vésicules en plus de lier les protéines motrices et réguler la signalisation des phospholipides (Donaldson and Jackson, 2011; Hsu et al., 2012).

Certains effecteurs des GTPases RAB et ARF, et certaines protéines RAB elles-mêmes, peuvent interagir directement avec les intégrines, régulant précisément quelles types spécifiques d'intégrines sont recyclées. Ces voies peuvent être classifiées en deux routes différentes, l'endocytose dépendante ou indépendante de la clathrine. La voie dépendante des clathrines repose notamment

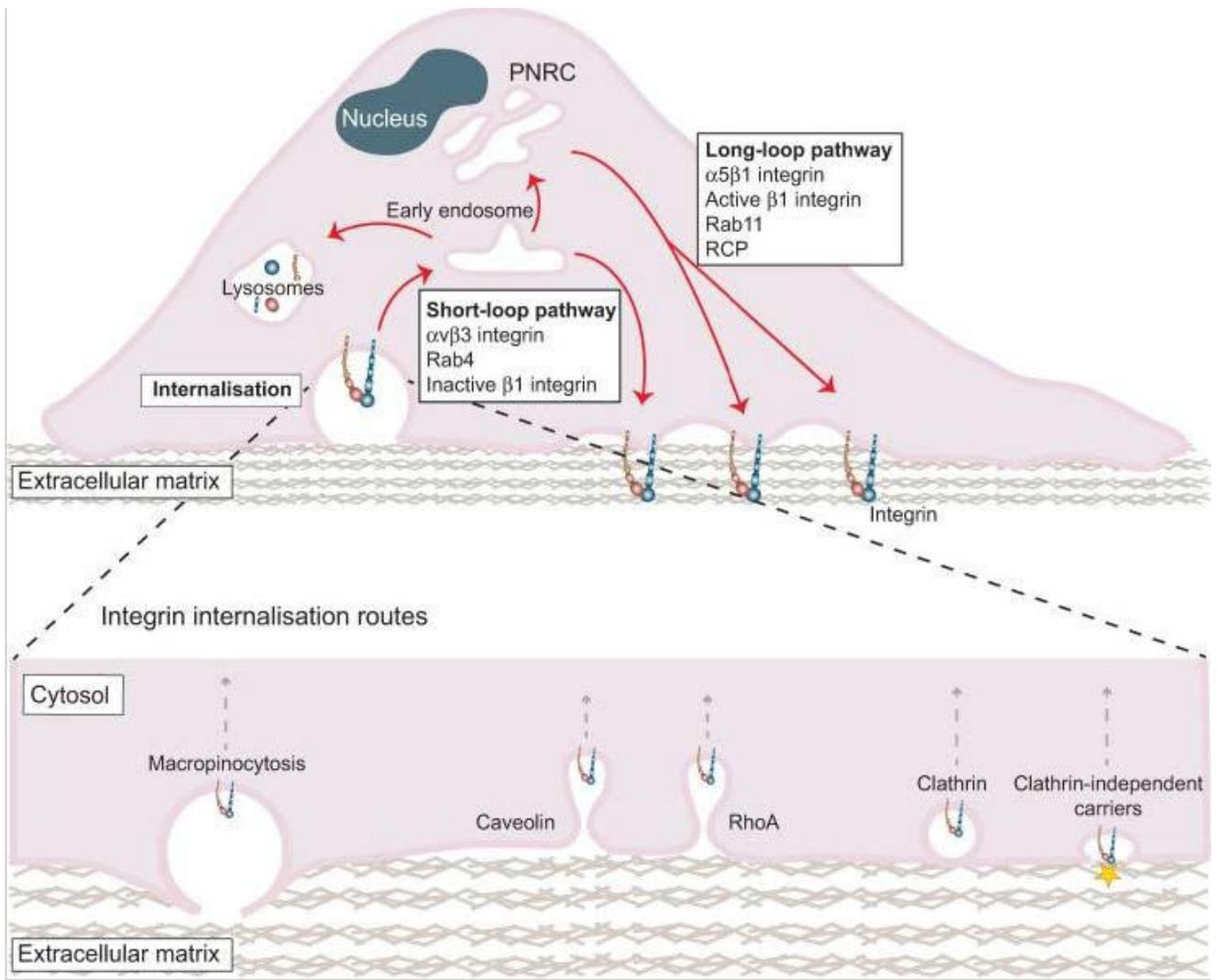


Figure 34 : Le recyclage des intégrines

Issue de De Franceschi et al., 2015

sur la macropinocytose (Gu et al., 2011), des projections membranaires riches en actine filamenteuse à la membrane apicale et *Rho-A* (Mai et al., 2014), les deux étant déclenchées par la signalisation des récepteurs aux facteurs de croissance. De plus, l'intégrine $\beta 1$ peut être endocytosée par des transporteurs indépendants de la clathrine. En contraste des autres routes d'endocytoses, cette voie dépendante des glycosphingolipides et de l'actine est initiée à la membrane extracellulaire. Là, la galectine-3 interagit avec le domaine extracellulaire glycosylé de $\beta 1$ et il a été suggéré que ceci induit la déformation mécanique de la membrane plasmique, ainsi que l'activation de récepteurs d'endocytoses indépendants des clathrines (Lakshminarayan et al., 2014).

La fin du recyclage avec le retour à la membrane des intégrines survient via l'un des deux mécanismes, qui sont distincts spatialement et temporellement, nommés voies de la boucle courte et de la boucle longue (Caswell and Norman, 2006; Morgan et al., 2009; Scita and Di Fiore, 2010). Le recyclage via la boucle courte est dépendant de RAB4 et induit un retour rapide des récepteurs à la membrane. Alternativement, les récepteurs entrent dans la boucle longue, relocalisent dans des compartiments périnucléaires RAB11-positifs avant de retourner à la membrane. Ces voies de recyclage facilitent l'adhésion et fournissent à la cellule une réserve constante d'intégrines prêtes à engager la matrice et générer de nouvelles adhésions.

4. Les différentes catégories d'intégrines

Figure 35 : Les sous-types d'intégrines selon leurs affinités

a. Les récepteurs d'adhésion leucocytaires

Dans les leucocytes, deux familles principales d'intégrines sont impliquées : la famille de $\beta 2$ celle d' $\alpha 4$.

L'intégrine $\beta 2$ est spécifique des leucocytes et peut s'associer à 4 sous unités α , formant les paires $\alpha L\beta 2$, $\alpha M\beta 2$, $\alpha X\beta 2$ et $\alpha D\beta 2$, toutes essentielles à la réponse immunitaire (Vanderslice and Woodside, 2006). La mutation aberrante de l'intégrine $\beta 2$ provoque le syndrome de déficience sévère d'adhérence des leucocyte de type 1 (LAD-1) (Kuijpers et al., 1997).

$\alpha L\beta 2$, aussi appelée LFA-1 (Leukocyte function associated antigen1), est le sous-type le plus abondant dans les leucocytes, son expression pouvant varier selon l'avancement de la différenciation cellulaire (Miller et al., 1986). En interagissant avec ses ligands naturels, ICAM-1, 2 et 3, $\alpha L\beta 2$ est impliquée dans la formation de la synapse immunologique dans la réponse immunitaire (de Fougerolles and Springer, 1992), ainsi que dans l'adhésion et l'extravasation des leucocytes à travers

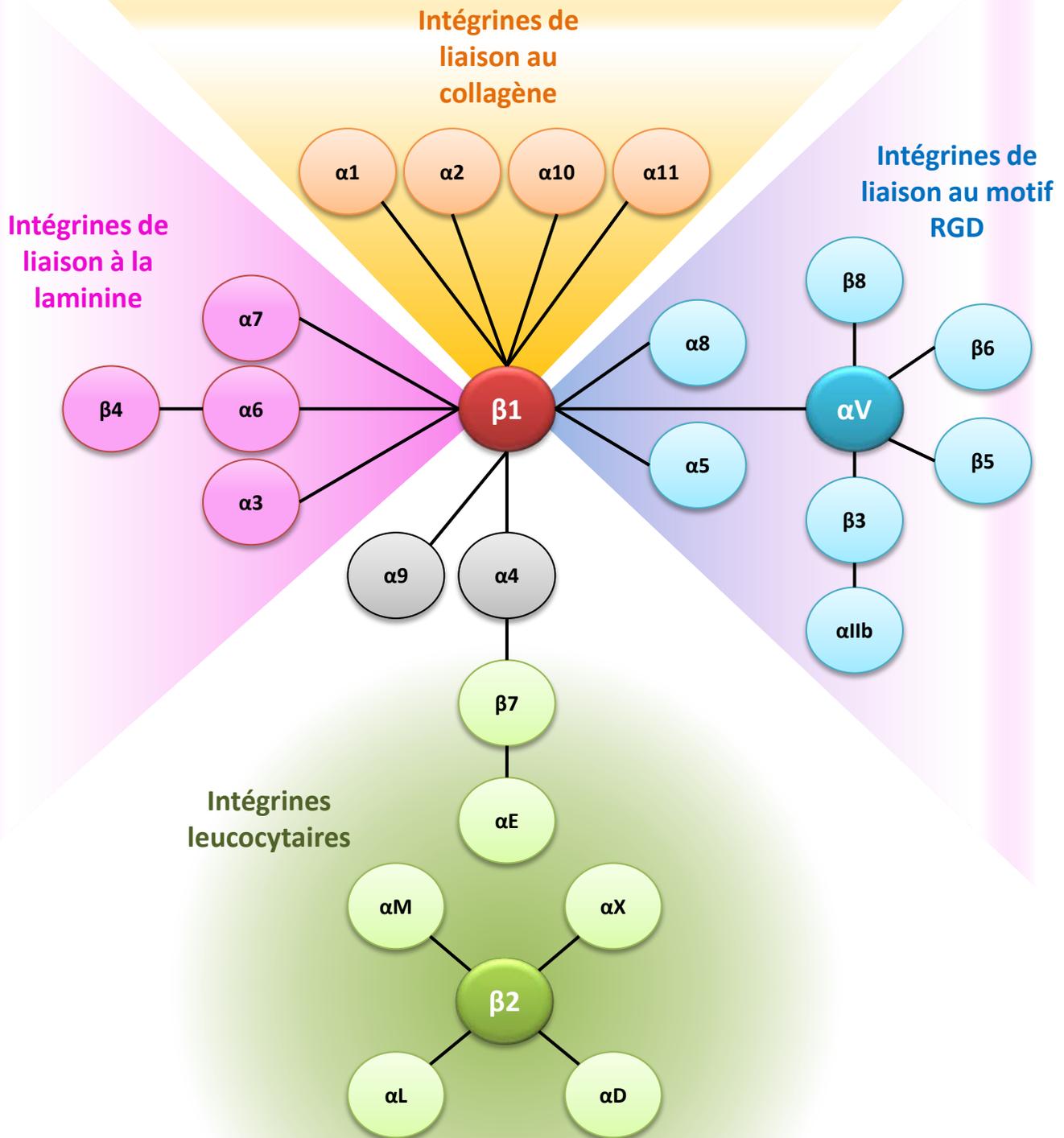


Figure 35 : Les sous-types d'intégrines selon leurs affinités

Adaptée de Margadant et al., 2011

l'endothélium (Dustin and Springer, 1988; Vanderslice and Woodside, 2006). Le récepteur $\alpha\text{L}\beta\text{2}$ est une très bonne cible thérapeutique dans le traitement de l'inflammation, des maladies auto-immunes, de l'AVC et de l'ischémie (Shimaoka and Springer, 2003).

La sous-unité α4 peut s'associer avec β1 et β7 pour former les sous-types $\alpha\text{4}\beta\text{1}$, ou VLA-4 (very late antigen 4), et $\alpha\text{4}\beta\text{7}$ (Berlin et al., 1993). Parmi les ligands naturels de ces intégrines il peut être cité VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule - 1) et la fibronectine via son domaine de liaison issue d'un épissage alternatif CS-1 (connecting segment - 1). La fibronectine est reconnue par $\alpha\text{4}\beta\text{1}$ via son épitope de liaison Leu-Asp-Val (Komoriya et al., 1991), et VCAM-1 interagit avec $\alpha\text{4}\beta\text{1}$ et $\alpha\text{4}\beta\text{7}$ par une séquence QIDSPL (Clements et al., 1994). $\alpha\text{4}\beta\text{7}$ peut également lier un troisième ligand, MAdCAM-1 (mucosal addressing cell adhesion molecule - 1) avec une relativement forte sélectivité (Shyjan et al., 1996).

L'intégrine $\alpha\text{4}\beta\text{1}$ est principalement exprimée à la surface des lymphocytes, des éosinophiles, des monocytes, des basophiles et des mastocytes, alors que $\alpha\text{4}\beta\text{7}$ est présente sur les lymphocytes T et B et sur les éosinophiles (Bochner et al., 1991; Erle et al., 1994). Ces deux sous-types d'intégrines jouent un rôle important dans la réponse immunitaire, à cause de leur implication dans les mécanismes d'adhésion, de migration et d'activation des leucocytes (Kinashi, 2012). L'infiltration leucocytaire sur les sites inflammatoires survient globalement en quatre étapes. Premièrement, les leucocytes s'accrochent faiblement à l'endothélium vasculaire et "roulent" à sa surface. Deuxièmement, le chimiotactisme du site induit l'activation des récepteurs de surface (sélectines, intégrines). Troisièmement, l'adhésion des leucocytes à l'endothélium augmente, jusqu'à la dernière étape, l'infiltration des leucocytes entre les cellules endothéliales (extravasation) (Ley et al., 2007).

Les maladies associées aux $\alpha\text{4}\beta\text{1}$ et $\alpha\text{4}\beta\text{7}$ sont principalement inflammatoires et auto-immunes, reliées à l'accumulation pathologique de leucocytes activés dans les tissus affectés. En exemple : inflammation intestinale, arthrite rhumatoïde, asthme, maladie de Crohn et sclérose multiple (Vanderslice and Woodside, 2006).

b. Les récepteurs au collagène

Les intégrines des sous-types $\alpha\text{1}\beta\text{1}$, $\alpha\text{2}\beta\text{1}$, $\alpha\text{10}\beta\text{1}$ et $\alpha\text{11}\beta\text{1}$ peuvent se lier à la triple hélice du collagène (White et al., 2004), la protéine matricielle la plus abondante dans les tissus fibreux comme la peau, le cartilage, les os et les vaisseaux sanguins, principalement produit par les fibroblastes. Les intégrines réceptrices au collagène se lient à leur ligand via un domaine spécial I (Von-Willebrand factor A-like domain), une sous-unité insérée dans la région hélicoïdale à l'interface entre les unités α et β et impliquée dans l'activation du récepteur et sa liaison au ligand.

La distribution d'expression et la spécificité du ligand varient significativement d'un sous-type à l'autre. Alors que $\alpha 1\beta 1$, aussi appelé VLA-1, se lie préférentiellement au collagène de type IV de la lame basale, $\alpha 2\beta 1$, ou VLA-2, interagit avec le collagène fibrillaire de type I avec une plus grande affinité (Dickeson et al., 1999; Tulla et al., 2001).

Les intégrines réceptrices au collagène sont largement impliquées dans les processus physiologiques tels que l'adhésion cellulaire, la migration et la prolifération, dans la réponse immunitaire (de Fougerolles et al., 2000) (expression dans les monocytes, les mastocytes et les granulocytes neutrophiles) ainsi que dans le remodelage de la matrice (muscles lisses, cellules endothéliales, fibroblastes). $\alpha 1\beta 1$ semble particulièrement impliquée dans la prolifération et $\alpha 2\beta 1$ dans le remodelage matriciel (White et al., 2004). $\alpha 10\beta 1$ et $\alpha 11\beta 1$ participent quant à elles au métabolisme des os et du cartilage (Camper et al., 2001; Tiger et al., 2001).

D'après des études basées sur des modèles animaux, $\alpha 1\beta 1$ joue un rôle pathologique dans l'angiogénèse cancéreuse (Pozzi et al., 2000), la fibrose (Gardner, 1999), l'inflammation (Fiorucci et al., 2002) et la réparation osseuse après une fracture (Ekholm et al., 2002).

$\alpha 2\beta 1$ est impliquée dans la liaison au collagène des plaquettes (Holtkotter et al., 2002) et est ainsi un acteur clef de la thrombose, en plus de son rôle dans l'inflammation. De hauts niveaux d'expression d' $\alpha 2\beta 1$ induisant un plus grand risque d'AVC et d'infarctus du myocarde (Moshfegh et al., 1999). Cette intégrine est également retrouvée surexprimée dans le cancer de la prostate (Hall et al., 2008), ainsi que dans plusieurs autres types (Klein et al., 1991).

c. Les récepteurs à la laminine

Les sous-types d'intégrines $\alpha 3\beta 1$, $\alpha 6\beta 1$, $\alpha 7\beta 1$ et $\alpha 6\beta 4$ se lient à la laminine (Belkin and Stepp, 2000), une classe de glycoprotéines retrouvée dans la lame basale. Les laminines sont des protéines trimériques contenant des chaînes α , β et γ (Cognato and Yurchenco, 2000). Elles jouent un rôle important dans la différenciation cellulaire, la migration et l'adhésion. Elles sont exprimées dans les cellules épithéliales et participent à l'adhésion de ces cellules à la lame basale (Mercurio et al., 2001). Comme de nombreuses tumeurs solides se développent à partir des cellules épithéliales, les intégrines liant la laminine sont retrouvées exprimées dans les cellules tumorales de plusieurs modèles, et, entre autres, sont responsables de la croissance tumorale et des métastases.

Un sous-type clef des récepteurs à la laminine est l'intégrine $\alpha 6\beta 4$, qui se lie préférentiellement à la laminine-5 (Gilcrease, 2007). La signalisation sous $\alpha 6\beta 4$ induit la prolifération des cellules épithéliales cutanées et joue un rôle dans l'invasion tumorale et la prolifération. Ainsi, de

nombreux carcinomes invasifs montrent des niveaux élevés de ce sous-type d'intégrine, qui permet *in vitro* d'améliorer les capacités invasives de carcinomes mammaires (Lipscomb et al., 2005).

d. Les récepteurs au motif RGD

Le motif RGD est le tripeptide Arg-Gly-Asp, originellement identifié comme la séquence au sein de la fibronectine responsable de l'adhésion cellulaire par l'intégrine spécifique $\alpha 5\beta 1$, et qui depuis a été retrouvé dans de nombreuses autres protéines, dont les intégrines. De plus, le collagène, connu pour provoquer une adhésion indépendante de la fibronectine, contient lui aussi une séquence RGD (Rubin et al., 1981; Schor and Court, 1979). Le contexte protéique où se situe le motif RGD, comme les résidus voisins et la structure 3D, détermine ses capacités d'interactions avec le site de liaison des intégrines (Haas and Plow, 1994).

Le récepteur plaquettaire $\alpha \text{IIb}\beta 3$, également connu comme le récepteur glycoprotéïque (GP)-IIb/IIIa, est une cible thérapeutique majeure du fait de son expression unique à la surface des plaquettes et des mégakaryocytes (Phillips et al., 1991), des cellules productrices de plaquettes de la moelle osseuse. L'intégrine $\alpha \text{IIb}\beta 3$ est impliquée dans l'agrégation des plaquettes durant l'hémostase primaire via le fibrinogène du plasma. Dans ce mécanisme d'agrégation, le fibrinogène relie deux plaquettes entre elles en liant les $\alpha \text{IIb}\beta 3$ de surface des deux cellules grâce à ses deux sites arborant le motif RGD (Hynes, 1992). Bloquer l' $\alpha \text{IIb}\beta 3$ par des anticorps monoclonaux a permis cliniquement de traiter le phénomène de thrombose.

Les intégrines $\alpha \text{v}\beta 3$ et $\alpha \text{v}\beta 5$ sont fortement exprimées dans les ostéoclastes, les cellules endothéliales et dans les tumeurs solides, et sont impliquées dans l'angiogénèse (Weis and Cheresh, 2011a). Au sein des protéines de la matrice extracellulaire, elles se lient préférentiellement à la vitronectine via son site RGD (Plow et al., 2000).

De plus, des antagonistes à l' $\alpha \text{v}\beta 3$ sont développés pour le traitement de l'ostéoporose, une maladie caractérisée par la perte de densité osseuse. Dans des conditions normales, une balance existe entre la résorption osseuse des ostéoclastes et la formation osseuse des ostéoblastes. Cependant, lors d'évènement comme la chute des estrogènes sanguins à la ménopause, l'équilibre est rompu en faveur des ostéoclastes et provoque à long terme la dégénération osseuse (Zhao et al., 2005). Comme $\alpha \text{v}\beta 3$ est exprimée à la surface des ostéoclastes, l'utilisation d'antagonistes permet de prévenir la résorption osseuse *in vitro* et *in vivo* (Masarachia et al., 1998), essentiellement en interférant avec la motilité des ostéoclastes (Chellaiah and Hruska, 2003).

B. Les intégrines comme acteurs clefs des structures cellulaires d'adhésion

1. Les fibres de stress et les adhésions focales

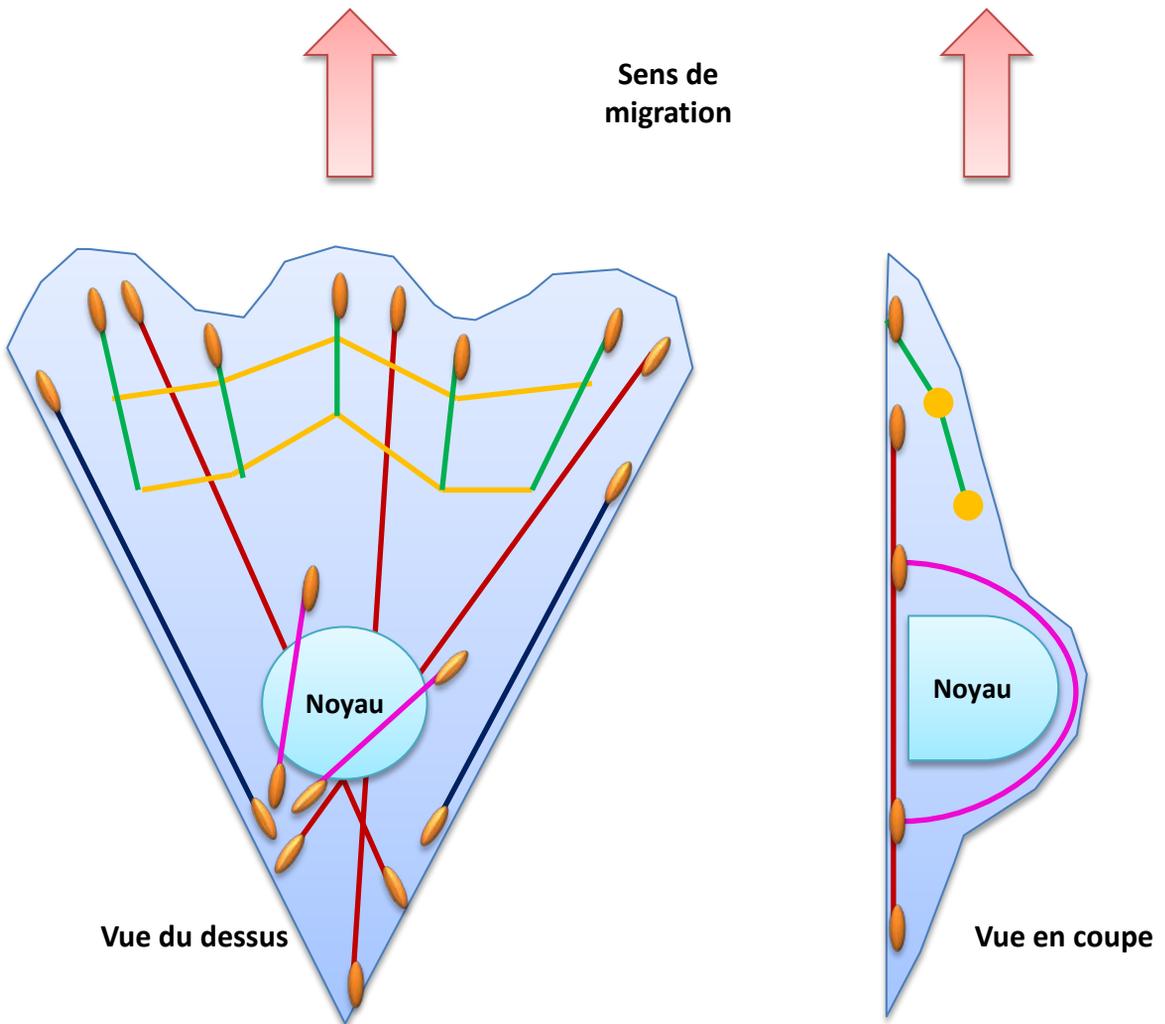
Figure 36 : Les fibres de stress

Les fibres de stress sont des assemblages de fibres d'actines réticulées. Elles sont, typiquement, divisées en trois types : fibres ventrales, dorsales et arcs transversaux. Ces trois types sont définis selon leur fonction, leur localisation cellulaire, leur structure et leur composition (Hotulainen and Lappalainen, 2006; Small et al., 1998).

Les fibres de stress dorsales sont longues, linéaires et non-contractiles, réticulées par l' α -actinine et composées de palladine et de la protéine VASP (Burnette et al., 2014; Gateva et al., 2014). Elles ne sont attachées qu'à la membrane ventrale via les adhésions focales en un ancrage unique et discret, habituellement proche des bords cellulaires. De là, elles s'étendent vers le centre de la cellule via une polymérisation de l'actine dépendante de VASP et de la formine (Hotulainen and Lappalainen, 2006; Skau et al., 2015; Tojkander et al., 2015). Leur rôle serait de servir de pistes sur lesquelles glissent les arcs transversaux (Hotulainen and Lappalainen, 2006; Tee et al., 2015).

Les arcs transversaux sont des structures d'actine allongées et incurvées, le long desquelles alternent des bandes répétées d' α -actinine et de myosine. Après leur formation aux lamellipodes via ARP2/3 et des fibres d'actines nucléées autour de la formine (Burnette et al., 2011; Hotulainen and Lappalainen, 2006; Tojkander et al., 2015; Zhang et al., 2003), les arcs transversaux glissent de manière centripète, sans ancrage aux adhésions focales, le long des fibres de stress dorsales par un mécanisme dépendant de la myosine II (Tee et al., 2015). Ils finissent par fusionner entre eux au centre de la cellule, formant un épais paquet d'actomyosine contractile.

Les fibres de stress ventrales combinent les propriétés des arcs transversaux et des fibres dorsales. Ces longues et linéaires structures d'actine s'étendent habituellement d'un bord à l'autre de la cellule, attachées à chaque extrémité à des adhésions focales. Cependant, leur centre est composé d'une alternance de bandes d' α -actinine et de myosine II de longueurs variables. L'un des mécanismes de formation des fibres de stress ventrales passe par la fusion d'arcs transversaux avec deux fibres dorsales (Hotulainen and Lappalainen, 2006; Tojkander et al., 2015). Les fibres ventrales incluent également deux sous-types de fibres : les fibres de stress périphériques, qui courent le long des bords stables des cellules (Prager-Khoutorsky et al., 2011), et les fibres de stress à bouchon d'actine, qui sont drapées autour du noyau (Kim et al., 2014). De manière intéressante, alors que la myosine II génère une force contractile aussi bien dans les arcs transversaux que les fibres ventrales, leurs effets sont distincts. Dans les arcs transversaux, ces forces s'exercent dans la cellule pour les



- Fibres de stress dorsales
- Arcs transversaux
- Fibres de stress ventrales
- Fibres de stress périphériques
- Fibres de stress en chapeau
- Adhésions focales

Figure 36 : Les fibres de stress

Adaptée de Burridge et al., 2015

rapprocher du centre (Hotulainen and Lappalainen, 2006). En contraste, les fibres de stress ventrales transmettent les forces générées par la myosine II au milieu extérieur via leur ancrage aux adhésions focales, permettant de sonder et d'interagir avec le microenvironnement (Balaban et al., 2001; Grashoff et al., 2010; Sabass et al., 2008).

Ainsi, même si les fibres dorsales et les arcs transversaux sont primordiaux pour l'étalement cellulaire, ce sont les fibres ventrales qui sont le plus retrouvées dans les cellules matures et qui semblent avoir un rôle clef dans les perceptions mécanosensibles cellulaires et l'interaction à la matrice extracellulaire via les adhésions focales (Pellegrin and Mellor, 2007).

Figure 37 : Les adhésions focales

Les adhésions focales sont situées au niveau de la membrane ventrale des cellules adhérentes, mesurent environ 1 micromètre de longueur et forment le lien entre la section terminale des fibres de stress et la matrice extracellulaire (MEC). Leurs composants cytoplasmiques s'attachent au fibres de stress, alors que leur composants extracellulaires s'ancrent à la MC via les intégrines. Les adhésions focales sont des complexes protéiques fortement régulés et composés de plus de 200 protéines distinctes, définies collectivement comme "l'adhésome des intégrines" (Byron et al., 2011; Kuo et al., 2011; Schiller et al., 2011; Zaidel-Bar and Geiger, 2010; Zaidel-Bar et al., 2007; Zamir and Geiger, 2001).

Les protéines des adhésions focales sont réparties en deux classes fonctionnelles de molécules : les protéines structurelles (la vinculine, la paxilline, la taline, la zyxine...) et celles de signalisation (FAK, certaines phosphatases, les activateurs et inhibiteurs des protéines G de la famille Rho...). Les protéines de la structure sont impliquées dans la formation et la stabilité de l'intégrité de l'adhésion focale, liant les fibres de stress à la MEC via les intégrines. Les protéines de signalisation sont recrutées sur le site d'adhésion, où elles génèrent et transmettent des signaux dépendant de l'adhésion, contrôlant localement le développement et le maintien de l'adhésion focale. Simultanément, ces protéines régulent de nombreux processus cellulaires clefs comme la prolifération, la différenciation, la survie et la migration (Wozniak et al., 2004).

Si les fibres de stress et les adhésions focales sont deux structures bien distinctes, elles sont clairement interdépendantes. La dissolution des fibres de stress (en inhibant la myosine II par le traitement à la blebbistatine, par exemple) s'accompagne du désassemblage rapide des adhésion focales. Inversement, les fibres de stress diminuent lorsque leur site d'ancrage disparaît lors de la migration cellulaire (Laukaitis et al., 2001), soit en interagissant avec les microtubules (Ezratty et al., 2005), soit suite à une inhibition de constituants spécifiques de l'adhésion focale comme la taline

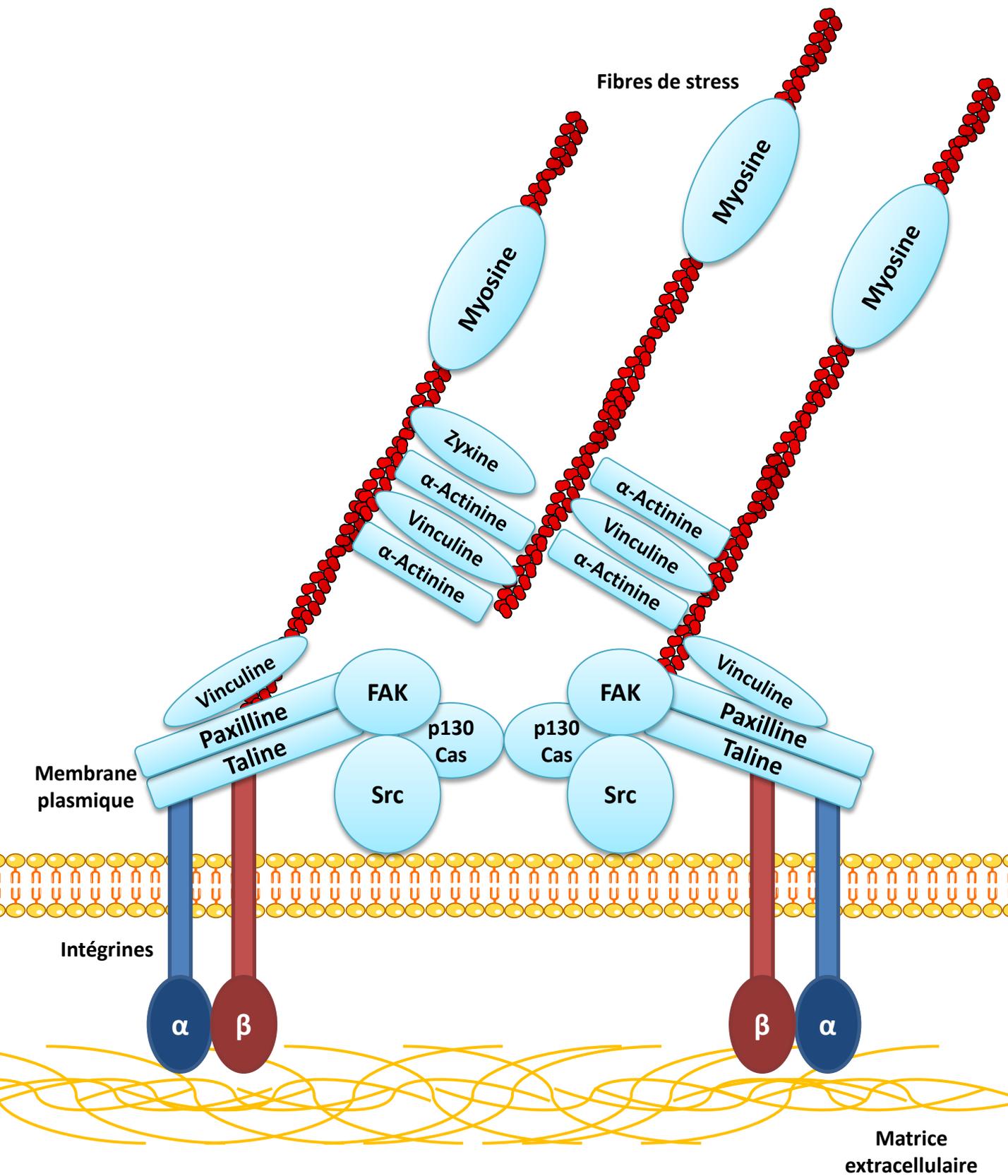


Figure 37 : Les adhésions focales
 Adaptée de Mitra et al., 2005

(Humphries et al., 2007). De plus, les fibres de stress se contractent lorsqu'elles sont séparées de leur adhésion focale, comme lors de la cassure en son milieu d'une fibre, laissant deux extrémités non ancrées (Colombelli et al., 2009; Kumar et al., 2006). Jusqu'à la formation d'une nouvelle adhésion focale, l'adhésion restante toujours connectée à la fibre de stress montre une perte rapide de la zyxine, dont la localisation est dépendante du stress mécanique (Colombelli et al., 2009; Zaidel-Bar et al., 2003).

Cette interdépendance entre les fibres de stress et l'adhésion focale se manifeste également par l'apparente corrélation entre plusieurs paramètres physiques de ces deux structures. Spécifiquement, il a été montré que la taille d'une adhésion focale change selon la charge mécanique qu'elle subit : lors de la génération de forces contractiles par la myosine II, l'aire des adhésions focales ancrées au substrat augmente, et réciproquement. Sur un substrat d'élastomères avec une rigidité d'environ 10 kPA, la relation entre force et aire se mesure à environ 5,5 nN/ μm^2 (Balaban et al., 2001). Ceci équivaut à un stress constant d'environ 5,5 kPA exercé par les adhésions focales au substrat, ce qui est en comparaison trois fois supérieur à la pression exercé par le flux sanguin sur les parois artérielles (Samijo et al., 1998).

Si de nombreux progrès ont été réalisés ces dernières années sur la classification des fibres de stress et la compréhension de leur rôle et leur mode d'assemblage, peu de choses sont connues en revanche sur la différence entre leurs sites spécifiques d'adhésion. Par exemple, comme la composition des adhésions focales est régulée par le stress mécanique (Lavelin et al., 2013; Yoshigi et al., 2005), la tension inférieure de fibres dorsales comparée aux fibres ventrales (Soine et al., 2015; Tojkander et al., 2015) doit résulter en des variations substantielles entre leurs adhésions focales. Formellement, il est suggéré que chaque type de fibres de stress est associé à un type d'adhésion focal spécifique. De plus, les forces transmises par l'adhésion associée aux différentes sortes de fibres de stress peuvent non seulement varier en magnitude mais aussi en direction. Les fibres ventrales sont parallèles au substrat, appliquant donc essentiellement des forces tangentielles (Balaban et al., 2001), tandis que les fibres dorsales (Burnette et al., 2014) et les fibres à bouchon d'actine (Kim et al., 2014) peuvent s'ancrer à leur site d'adhésion perpendiculairement au substrat (Hur et al., 2009), impliquant des forces difficilement quantifiables par les méthodes de détection 2D.

Naturellement, les fibres de stress interagissent mécaniquement non seulement avec les adhésions focales mais aussi avec d'autres structures cellulaires, notamment des fibres de stress voisines et le cortex d'actine. Similairement, les adhésions focales n'interagissent pas exclusivement avec les fibres de stress même si elles sont leurs partenaires privilégiés.

2. Les invadosomes : podosomes et invadopodes

Figure 38 : Structure des invadosomes

Historiquement, les podosomes ont été découverts dans des fibroblastes embryonnaires de poulet infectés au virus du sarcome de Rous, induisant l'oncogène *v-src* et relocalisant la vinculine et l' α -actinine des adhésions focales vers de nouvelles structures en rosette. Celles-ci étant impliquées dans l'adhésion cellulaire, elles furent considérées comme les "pieds" des cellules, d'où le nom de podosomes. Il fut constaté ensuite que ces podosomes étaient capables de dégrader la matrice extracellulaire et se localisaient au niveau de protrusions cytoplasmiques des cellules au fort potentiel invasif, comme les macrophages, les cellules dendritiques, les cellules cancéreuses etc., étant alors renommés invadopodes. Il y a donc une certaine confusion sémantique entre les deux termes, les structures auxquelles ils se réfèrent étant fondamentalement identiques, mais le terme podosome renvoie au rôle d'adhésion cellulaire tandis qu'invadopode se réfère à l'invasion.

Aujourd'hui, le terme générique d'invadosome émerge, mais les occurrences de podosome et d'invadopode étant répandus dans la littérature il devient commun d'utiliser podosome dans le cas de cellules normales non transformées et de préférer invadopode pour les cellules cancéreuses (Murphy and Courtneidge, 2011). Il subsiste cependant certaines différences subtiles entre les deux structures, avec des changements morphologiques et une distribution protéique quelque peu distinctes, impliquant une capacité des invadopodes à pénétrer plus profondément la MEC que les podosomes, car les premiers bénéficient d'un renouvellement plus lent que les seconds (respectivement quelques heures pour quelques minutes) (Weaver, 2008).

Il est aussi important de distinguer les invadosomes des autres protrusions cellulaires, comme les filopodes et les lamellipodes, et des structures adhésives telles que les adhésions focales. Toutes ces structures partagent toutefois de nombreuses protéines, tels les acteurs impliqués dans la polymérisation de l'actine (Block et al., 2008; Gimona et al., 2008).

Les invadosomes sont caractérisés par un cœur riche en actine, entouré de protéines structurales et d'adhésion (Linder and Kopp, 2005). Un ensemble de nucléateurs de l'actine, des activateurs de la polymérisation, des protéines de liaison et de réticulation de l'actine, des kinases, des petites GTPases et des protéines structurelles régulent la machinerie de l'actine. Parmi les acteurs majeurs de sa régulation on retrouve les adaptateurs protéiques TKS4 et TKS5 (Tyr kinase substrate with 4 or 5 SH3 domains), la cortactine, N-WASP, SRC, la MT1MMP et les intégrines (Buccione et al., 2009; Clark and Weaver, 2008; Gimona et al., 2008; Stylli et al., 2008).

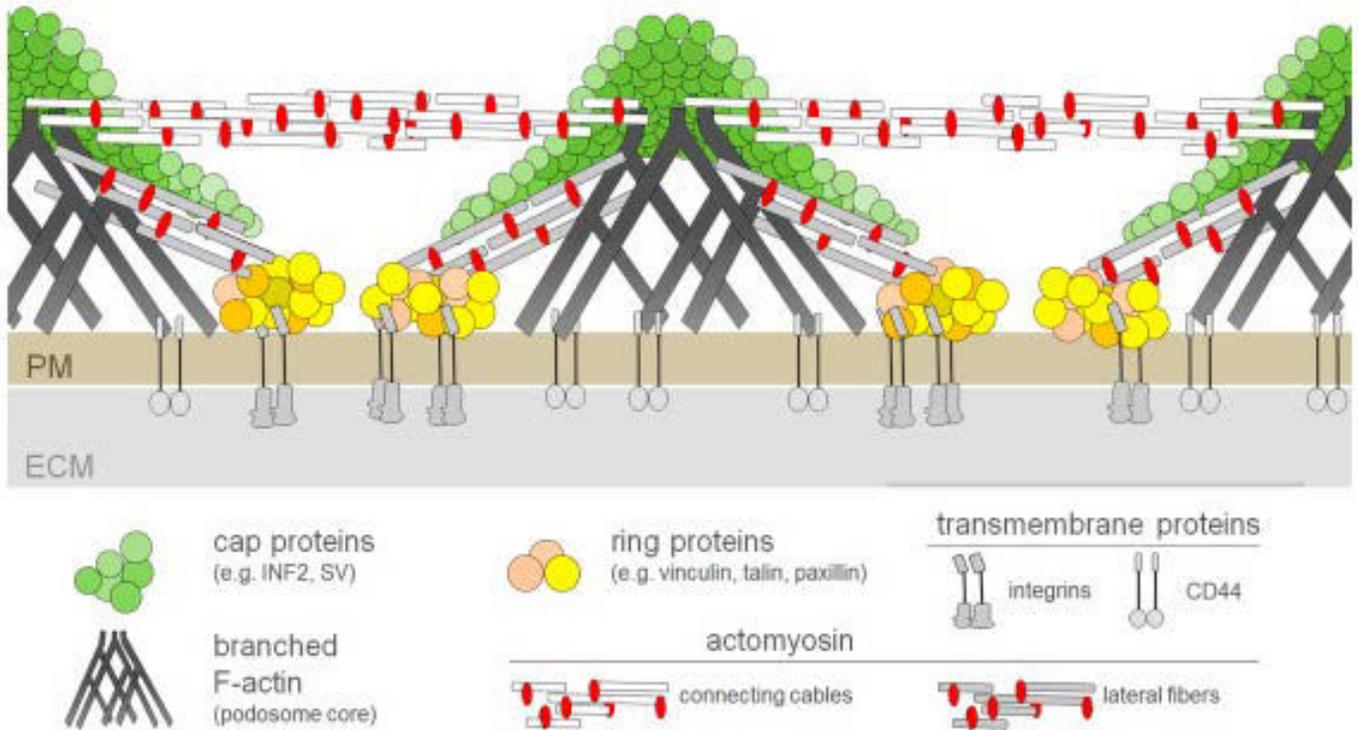


Figure 38 : Structure des invadosomes
 Issue de Linder et al., 2015

Les invadosomes permettent à la cellule de coordonner la dégradation de la matrice avec la motilité cellulaire, afin de faciliter la migration à travers les microenvironnements tissulaires. Les podosomes sont retrouvés dans les types cellulaires impliqués dans le remodelage des tissus et la surveillance immunitaire : la présence d'invadopodes est corrélée avec le potentiel invasif et métastatique des cellules cancéreuses. Leur maturation implique le recrutement et l'activation de multiples protéases péricellulaires qui facilitent la dégradation de la MEC (Artym et al., 2006; Clark et al., 2007). Trois classes principales de protéases sont impliquées : les métalloprotéases régulées par le zinc (MMP2, MMP9, MT1MMP et les sheddases de la famille ADAM), les protéases Cys cathepsines et les protéases Ser UPAR (seprase and urokinase plasminogen activator surface receptor) (Linder, 2007; Stylli et al., 2008). Les podosomes et les invadopodes peuvent également agir comme mécanosenseurs, et exercer une traction sur la matrice extracellulaire par un processus dépendant de la MT1MMP (Albiges-Rizo et al., 2009; Collin et al., 2008).

Figure 39 : Maturation et activation des invadosomes

Les récepteurs aux intégrines interagissent directement avec la MEC, et sont donc idéalement placés pour moduler les invadosomes. De nombreuses études rapportent la présence d'intégrines dans les podosomes et les invadopodes. L'intégrine $\alpha\beta3$ est retrouvée dans les podosomes des ostéoclastes et dans les invadopodes de nombreux cancers (Gimona et al., 2008; Zamboni-Zallone et al., 1989), tandis que la sous-unité $\beta1$ a été identifiée aussi bien dans les podosomes que les invadopodes (Helfrich et al., 1996; Mueller and Chen, 1991).

Peu de travaux se sont directement intéressés au rôle des intégrines dans ces structures, bien que la formation des invadosomes soit modulée par la présence de composés matriciels (Destaing et al., 2010; Gawden-Bone et al., 2010). L'activation de $\beta1$ par des anticorps stimule la dégradation de la MEC (Nakahara et al., 1998), tandis qu'interférer avec $\alpha\beta3$ dans les ostéoclastes inactive fonctionnellement les podosomes (Blouw et al., 2008). L'implication de la MEC et des intégrines dans la régulation de la formation des podosomes et des invadopodes a été étudiée dans les ostéoclastes et les fibroblastes transformés par SRC (Destaing et al., 2010), ces deux modèles exprimant les sous-unités $\beta1$ et $\beta3$. Les invadopodes se forment même en absence de l'intégrine $\beta3$, mais la constitution des podosomes et des invadopodes est totalement inhibée lors de la perte de l'intégrine $\beta1$. De plus, la phosphorylation de la queue cytoplasmique de $\beta1$ augmente la formation de rosettes. De manière intéressante, la perte de $\beta1$ renforce également la formation d'adhésions focales, ce qui corrobore l'idée d'une relation poussée entre les deux structures (Destaing et al., 2010).

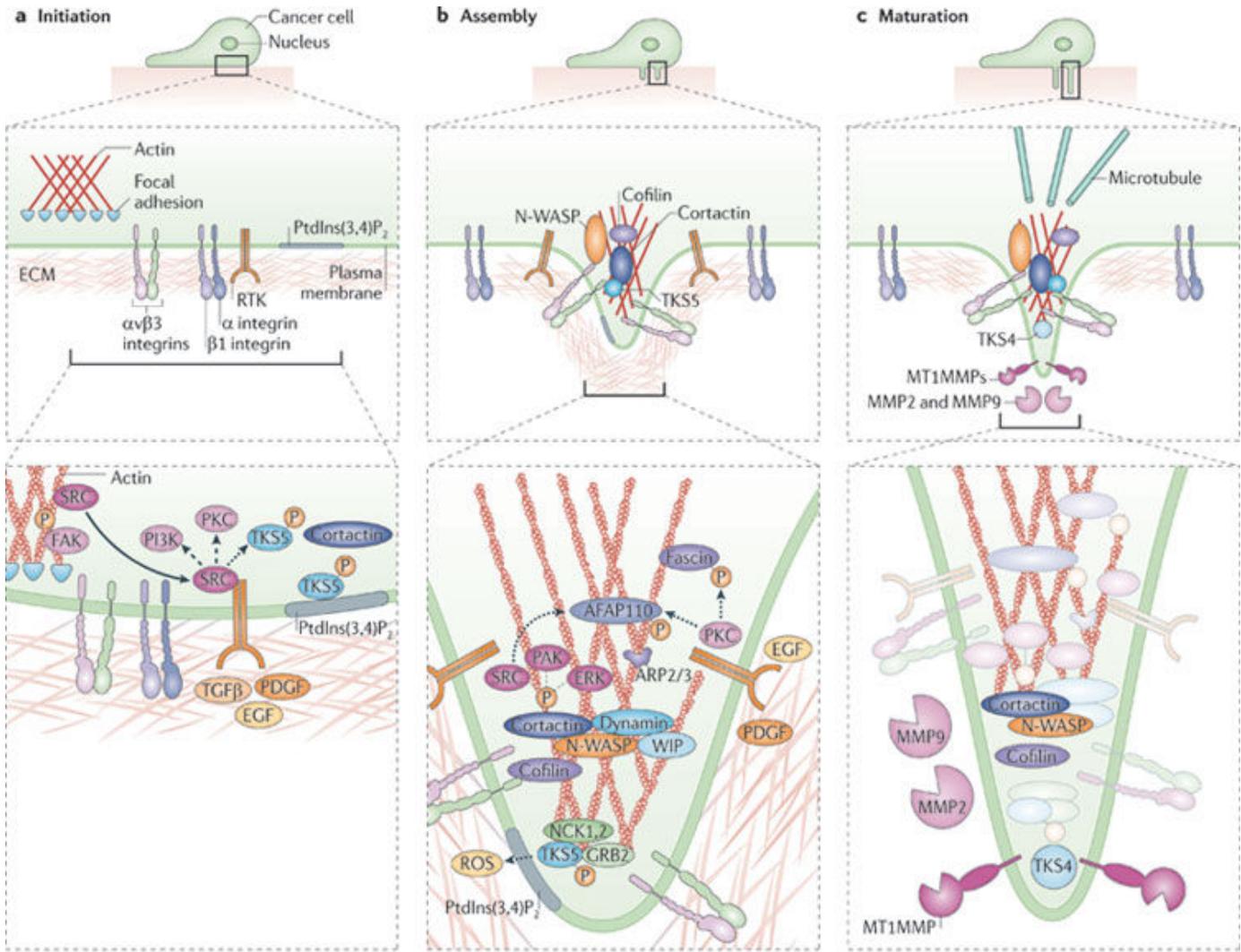


Figure 39 : Maturation et activation des invadosomes

Issue de Murphy et al., 2011

C. La migration cellulaire

On ne peut pas parler de la voie des intégrines sans évoquer leur implication dans les nombreux processus de migration cellulaire. De par leur importance dans les mécanismes d'adhésion, de remodelage de la matrice extracellulaire ou de survie, les intégrines sont des facteurs clefs de la migration.

Les mécanismes de migrations permettent aux cellules de s'assembler, se positionner, se restructurer, défendre et réparer les organismes multicellulaires (Friedl and Weigel, 2008; Scarpa and Mayor, 2016; Sonnemann and Bement, 2011). C'est en conséquence un processus très plastique, qui permet aux cellules d'atteindre et changer leur positionnement dans un environnement donné pour exécuter leurs fonctions, former ou abandonner des assemblages de cellules avoisinantes, se déplacer individuellement ou collectivement, et interagir mécaniquement et chimiquement avec les composants structurels des tissus et ainsi altérer la composition et l'organisation des tissus interstitiels (Friedl et al., 2012; Rowe and Weiss, 2009).

Ces processus sont contrôlés par des programmes moléculaires permettant à la cellule de percevoir, interagir et (si besoin) remodeler la structure des tissus lors de leur déplacement ou ancrage (Chen et al., 2004). En dépit de l'énorme complexité de la migration cellulaire et de sa potentielle vulnérabilité aux assauts mécaniques et signalétiques, le processus est robuste et résistant. Par la redondance et la complémentarité des voies de signalisations, les cellules sont équipées de nombreuses stratégies pour s'adapter et assurer la migration cellulaire (Friedl and Wolf, 2010).

1. Les modèles de migration cellulaire

Les cellules peuvent migrer soit individuellement, grâce à l'activité du cytosquelette et sans interactions cellule-cellule avec les cellules avoisinantes (Ridley et al., 2003), soit collectivement, en un groupe cohésif qui maintient ses jonctions cellule-cellule et coordonne leur cytosquelette entre cellules et avec les tissus avoisinants (Friedl and Gilmour, 2009).

Le modèle général de la migration individuelle se réfère aux déplacements des leucocytes en transit entre et à travers les tissus au cours de leur fonction de surveillance de l'organisme (Friedl and Weigel, 2008), mais aussi à la production, dépôt et réabsorption de matrice extracellulaire par les cellules stromales (Grinnell and Petroll, 2010), et enfin aux capacités d'intégration et d'ancrage dans une nouvelle niche des cellules souches (Paksa and Raz, 2015). *In vivo*, il est possible de distinguer deux modes de migrations individuelles en se basant sur la morphologie, les mouvements et les fonctions cellulaires : les mouvements amiboïdes et mésenchymateux.

La migration collective survient lorsque les cellules maintiennent leur jonctions cellule-cellule avec leur voisines et bougent comme un groupe coordonné (Friedl and Gilmour, 2009). Leur morphologie collective, leur dynamique et leur devenir sont déterminés par le type et la stabilité des jonctions intercellulaires et des conditions extracellulaires.

Ces types de migrations, individuelle ou collective, sont contrôlés par des programmes moléculaires définissant leur spécificité, leur force mécanique et leur renouvellement, et conditionnent les interactions cellule-cellule et cellule-matrice.

Figure 40 : La migration, individuelle ou collective

a. La migration individuelle

Les cellules individuelles perçoivent les stimuli de migration et les indications de directions via leur front de migration. Ce front est guidé par des stimuli physiques, comme des discontinuités structurelles du substrat détectées par les récepteurs d'adhésions, ou par une induction chimique de facteurs autocrines ou paracrines. Ces signaux convergent à la membrane, provoquant la transition du PIP2 en PIP3 et activent RAC ou CDC42, permettant aux cellules de passer d'un comportement sédentaire à mobile (Heit et al., 2002; Kolsch et al., 2008). La localisation des protrusions définit la direction du mouvement, et un changement de polarité induit un changement de direction. Par la production différentielle de protrusions, les cellules individuelles décident quoi suivre entre les différents gradients d'attractions (Heit et al., 2002) et les différentes cytokines solubles ou immobiles (Weber et al., 2013), ajustant la direction de leur migration selon la disponibilité en ligand d'adhésion et de l'organisation géométrique des tissus (Doyle et al., 2009; Starke et al., 2014). En modulant RAC et CDC42, le front de migration de la cellule peut adopter différentes formes et changer de types de protrusions, incluant les lamellipodes, les filopodes, les lobopodes et les "blebs", séquentiellement ou simultanément (Bergert et al., 2012; Petrie and Yamada, 2012; Roubinet et al., 2012; Starke et al., 2014). Les différents types de protrusion diffèrent dans leur forme, leur cinétique et leurs protéines de liaisons à l'actine (Sarmiento et al., 2008; Tseng et al., 2001), ainsi que dans leur capacité à focaliser l'actine, les intégrines et les protéases de surfaces, induisant des variations dans leur capacités à adhérer, générer des forces mécaniques et dégrader la matrice.

b. La migration collective

La direction prise lors d'une migration collective peut être déterminée par deux mécanismes distincts, les décisions prises par la cellule de tête et le dépôt de matrice extracellulaire. La cellule de

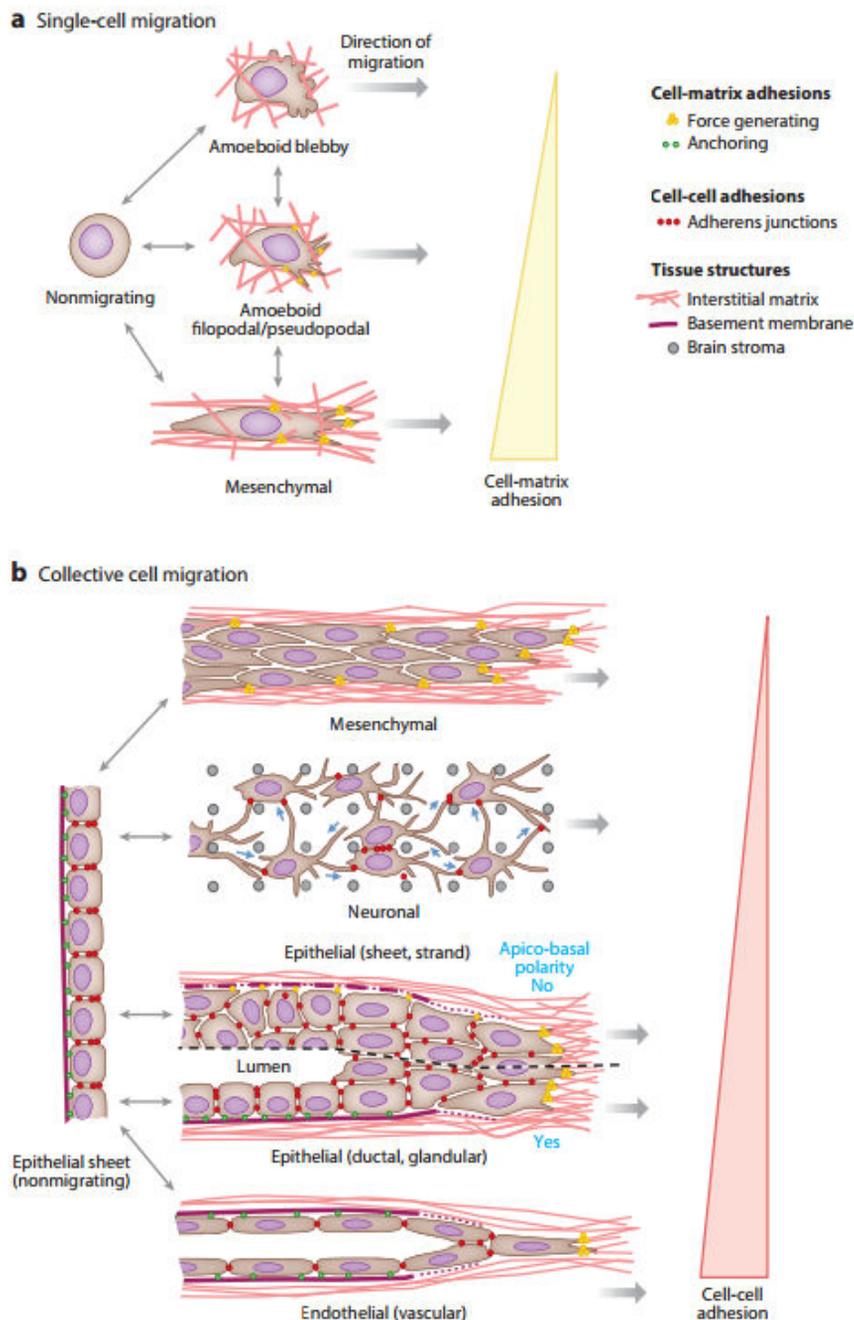


Figure 40 : La migration, individuelle ou collective

Issue de Boekhorst et al., 2016

(a) Transition d'une cellule isolée immobile à migratrice. Les caractéristiques du mouvement amiboïde sont une forme arrondie, et un front très dynamique formant des protrusions de type « bleb », des dendrites, des filopodes ou des pseudopodes aux capacités d'adhésion limitées. Le mouvement mésenchymateux génère une forme de cellule allongée, avec des extensions dans l'axe antéro-postérieure et une adhésion renforcée.

(b) Le mode de migration collective dépend de la morphologie cellulaire et de la force des interactions cellule-cellule. Le mouvement mésenchymateux collectif est caractérisé par une forte densité cellulaire, des jonctions cellule-cellule faibles et survient lors d'un confinement important. Le mouvement neuronal est utilisé par les astrocytes et les cellules de gliome migrant à travers le stroma du cerveau, conservant des jonctions filamenteuses. La migration des cellules épithéliales est maintenue par une adhésion cellule-cellule très forte décourageant l'individualisation, son mouvement est soit en couche ou multicouche épithéliale, soit conserve une polarité apico-basale et un lumen. Le mouvement collectif endothélial mène au bourgeonnement vasculaire, avec une forte adhésion cellule-cellule étanche préservant et la polarité apico-basale pour le lumen, et la polarité antéro-postérieure de la cellule de tête.

tête détecte et suit les repères des tissus ainsi que les facteurs pro-migration, dirigeant le groupe entier. La cellule de tête guide les autres via des chimiokines comme SDF-1, tandis que la production de morphogènes comme le FGF et l'HGF définissent l'émergence de branches latérales, comme lors de l'angiogénèse (Xu et al., 2014). Les branches peuvent être induites par le dépôt de protéines matricielles par des cellules épithéliales mouvantes, comme la fibronectine, qui cause des bifurcations et initialement sépare les compartiments tissulaires (Larsen et al., 2006; Sakai et al., 2003).

c. Plasticité de la migration

La migration collective peut se convertir en migration individuelle, via un détachement des cellules du groupe par des déplacements mésenchymaux ou amiboïdes. Au moins deux mécanismes d'individualisation supportent ce détachement, l'"unjamming" (débouillage) et l'inhibition des jonctions adhérentes (Haeger et al., 2015).

Avant l'"unjamming", les cellules migratrices conservent des jonctions cellule-cellule faibles, leur cohésion n'étant assurée que par le fait qu'elles se déplacent dans des espaces confinés, comme les cellules mésenchymateuses migrant dans des structures en tube dans un collagène dense (Haeger et al., 2014; Iliina et al., 2011), ou *in vivo* dans l'espace interstitiel (Weigel et al., 2016). Lorsque les cellules émergent dans un milieu moins confiné elles se libèrent les unes des autres (Haeger et al., 2014).

L'inhibition transcriptionnelle des jonctions adhérentes, des jonctions serrées et des desmosomes survient lors de la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT). L'EMT est induite par des déclencheurs extracellulaires, comme les cytokines, les facteurs de croissance et le stress métabolique, menant à l'internalisation du tube neural, la transition de la cadhérine E vers la cadhérine N, et l'induction de la migration (Nieto, 2011; Theveneau and Mayor, 2012). Les cellules ont donc moins d'attaches intercellulaires, se détachent de l'épithélium et bougent individuellement. Les modifications induites par l'EMT sont plus détaillées dans la sous-partie consacrée dans le chapitre I.

Selon qu'elles retiennent ou non des interactions intercellulaires et qu'elles traversent des espaces confinés, les cellules peuvent alterner d'une migration collective à individuelle et vice versa.

2. Guider la migration, une histoire de -taxie

Figure 41 : Les différents types de migration

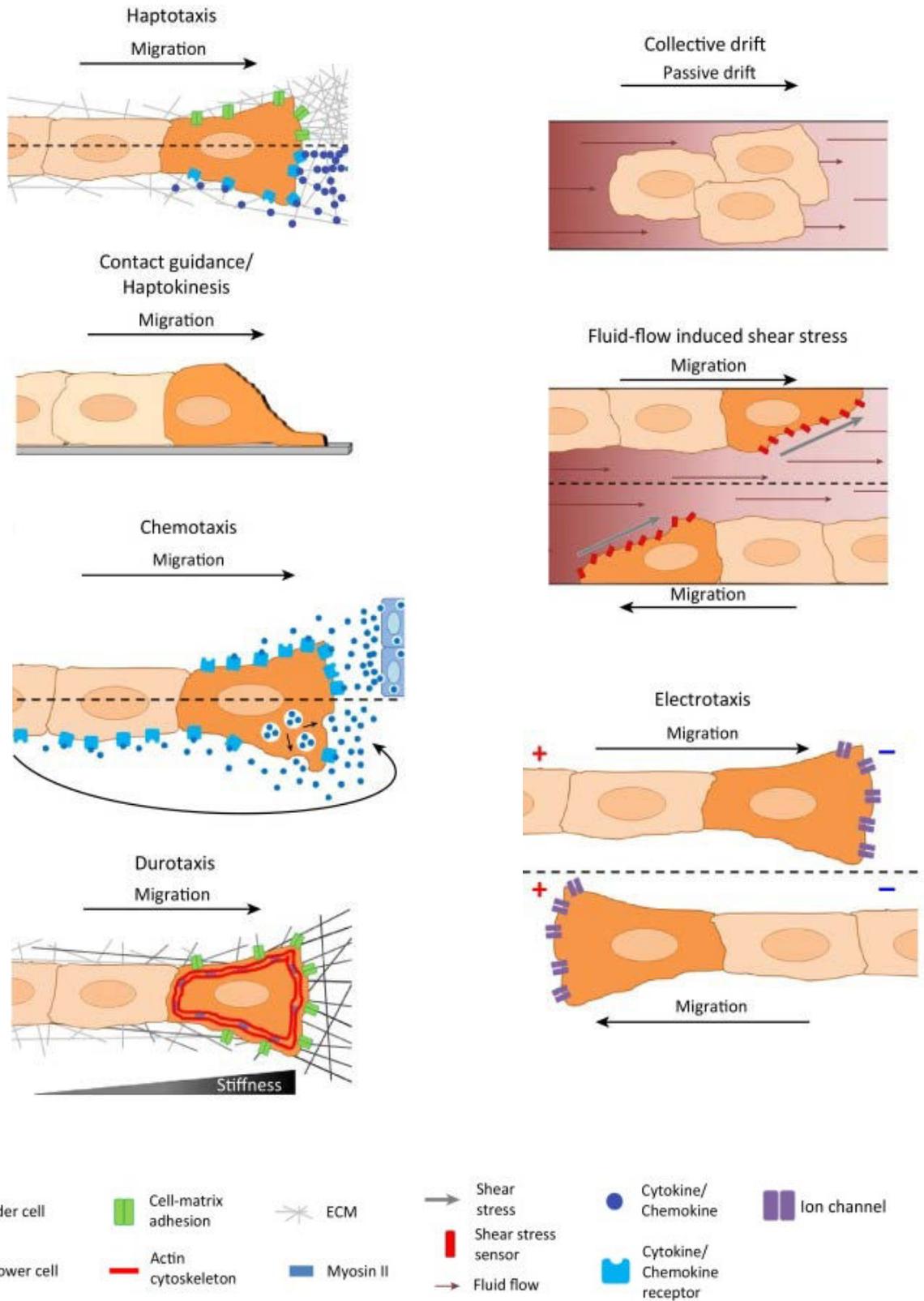


Figure 41 : Les différents types de migration

Issue de Haeger et al., 2015

a. L'haptotaxie et l'haptoréulsion

L'haptotaxie décrit une migration dirigée par une combinaison de facteurs physiques et chimiques le long de ligands immobiles (Carter, 1967). Le gradient de ligands peut résulter de niveaux ou de distribution différents des protéines matricielles, incluant le collagène, la fibronectine et les laminines, les cytokines et chimio-attractants liés à la matrice, et/ou les molécules d'adhésion présentes sur les cellules rencontrées (cadhérines, CAMs, intégrines...). Les cellules orientent habituellement leur migration vers les sites présentant le plus de possibilités d'adhésion, cependant le mouvement peut également se tourner en sens inverse vers la plus faible densité de ligands en fonction des cellules et des récepteurs d'adhésions impliqués (Bauer et al., 2009; Chan et al., 2014).

Avec l'haptotaxie en tant que premier événement, les cellules de tête peuvent renforcer ou opposer l'attraction à quatre niveaux : en sentant et répondant au signal d'attraction, en déposant des composés matriciels et formant de nouveaux sites d'adhésion (Nguyen et al., 2000; Stratman and Davis, 2012), en retirant des sites d'adhésion par dégradation de la matrice (Daub and Merks, 2013; Gritsenko et al., 2012), et enfin en remodelant la matrice via une action paracrine de dépôt de cytokines et chimiokines (Egeblad et al., 2010). Les trois derniers, en modifiant les tissus traversés, affectent l'attraction des cellules suivantes.

Le mécanisme de répulsion est défini par le guidage des cellules loin de la structure rencontrée. La répulsion haptokinétique peut être médiée via la communication cellule-cellule, par exemple par interaction du récepteur tyrosine kinase à l'ephrine avec son ligand associé à la membrane des cellules voisines (Park and Lee, 2015; Sugiyama et al., 2013), ou via des voies de signalisation en aval d'autres molécules d'adhésion cellule-cellule comme la cadhérine N (Fagotto et al., 2013; Theveneau et al., 2013).

La signalisation en aval de la répulsion induit l'inhibition de RAC, le désassemblage des adhésions focales et l'effondrement des protrusions cellulaires suivi par la réorientation de la cellule dans la direction opposée (Theveneau et al., 2013). De plus, la répulsion provoque une contractilité dépendante de Rho aux limites cellulaires, ce qui prévient l'établissement de jonctions cellulaires stables et supporte la séparation entre cellules et tissus (Fagotto et al., 2013).

b. L'haptokinésie

L'haptokinésie est un processus de guidage cellulaire résultant de l'orientation de l'axe longitudinal des cellules et des mouvements le long de repères topographiques fournis par l'environnement (Dickinson et al., 1994). Pour permettre l'haptokinésie, les récepteurs d'adhésion

s'engagent avec le substrat et "sentent" les repères topographiques avant de s'y coupler mécaniquement (Dee et al., 1999; Maheshwari and Lauffenburger, 1998). Ces repères peuvent être des composants de la matrice, incluant les fibres de collagène ou la lame basale, ou des structures tissulaire complexe comme les pistes neuronales, les fibres musculaires ou le tissu adipeux. A des degrés divers, ces structures sont respectées par les cellules migratrices, servant de pistes orientant la migration mais aussi de barrière protégeant l'environnement adjacent de l'invasion (Ilina et al., 2011; Weigelin et al., 2016; Weiner et al., 2007; Yevick et al., 2015). Etant donné la complexité des mouvements cellulaires, il n'est pas encore clair quand et comment les cellules exercent une haptokinèse active ou sont simplement emportées par une route restrictive.

c. La chimiotaxie

L'orientation de la migration cellulaire via des solutés chimiques est nommée chimiotaxie, pouvant être attractrice ou répulsive. La chimio-attraction est le mouvement chimiotactique le long d'un gradient de solutés chimiques, incluant les chimiokines et les cytokines mais aussi le pH et les espèces réactives de l'oxygène (Majumdar et al., 2014). Basés sur la diffusion et la convection, la chimiotaxie est rapide mais limitée dans le temps, en contraste des signaux plus durables de l'haptotaxie et haptoréulsion. La liaison des récepteurs et leur activation par les molécules chimioattractantes induisent localement une signalisation en aval et des protrusions cytoplasmiques suivies d'une polarisation cellulaire et de mouvement vers la plus grande disponibilité en soluté (Insall, 2010). En réponse au gradient, la polarité est renforcée par l'activation préférentielle de voies de signalisation dans les cellules de tête lors de la migration collective, ce qui stimule la migration et stabilise la polarité et la cohésion cellule-cellule (Theveneau et al., 2010; Wan et al., 2013).

La chimiotaxie est typiquement un mécanisme paracrine, via la diffusion de molécules sécrétées par d'autres cellules voisines (Bagorda and Parent, 2008; Tessier-Lavigne, 1994), mais peut également être induite ou maintenue par les cellules elles-mêmes (Cai and Montell, 2014; Majumdar et al., 2014). Dans la migration collective, un gradient peut être établi entre le groupe de tête et celui de queue, par exemple en relâchant à la tête des facteurs stimulant la migration (Kriebel et al., 2008), en produisant des enzymes dégradant les chimiokines afin de "purifier" l'axe de migration (Garcia et al., 2009), et enfin en piégeant via des récepteurs leurres certaines molécules afin de restreindre l'attraction d'autres cellules (Cai and Montell, 2014; Dona et al., 2013). Ainsi, le récepteur CXCR7, exprimé préférentiellement en queue d'une migration collective, séquestre le SDF-1 stromal et génère un gradient pour guider des migrations successives induites par CXCR4 (Dona et al., 2013; Valentin et al., 2007; Venkiteswaran et al., 2013).

La chimio-répulsion décrit le mouvement inverse, la fuite des cellules par rapport à la source d'un stimulus chimique. Similaire à la chimio-attraction, les récepteurs lient les molécules solubles et induisent une signalisation locale, induisant la formation de protrusions au pôle opposé de la cellule (Bagorda and Parent, 2008; Tessier-Lavigne, 1994). La chimio-répulsion a un rôle très important dans le développement embryonnaire, où la migration collective est repoussée par des morphogènes comme le FGF8 et Wnt3a, qui repoussent le feuillet du mésoderme durant la gastrulation (Weijer, 2009).

d. La durotaxie

La durotaxie est le déplacement des cellules migrant en réponse à un gradient de rigidité du substrat, pouvant être orientée positivement (vers la plus grande rigidité), négativement (vers la plus faible rigidité), ou perpendiculairement (le long d'une rigidité constante) au gradient (Harland et al., 2011; Lo et al., 2000).

La durotaxie positive est prévalente dans la migration des fibroblastes vers les régions de haute rigidité lorsqu'ils sont placés sur une matrice à la rigidité variable (Wong et al., 2014), ce qui résulte d'une signalisation mécano-sensible, incluant les intégrines des adhésions focales et la génération de la force de traction par la contraction de la myosine II (Fouchard et al., 2011; Lange and Fabry, 2013). La migration collective des cellules de sarcomes est augmentée sur des substrats rigides par rapport à d'autres plus souples (Beaune et al., 2014).

Cependant, les mécanismes grâce auxquels les groupes de cellules intègrent les gradient de rigidité pour percevoir la direction restent à être explorés.

e. Les flux et les contraintes de cisaillement

Les cellules peuvent migrer dans un flux liquide, comme dans les vaisseaux sanguins ou le tractus urinaire, suivant une attraction spécifique.

Les cellules peuvent dériver lorsqu'elles pénètrent un flux sans adhérer aux parois du vaisseau, comme dans le cas de cellules passivement emportées par le sang ou la lymphe, ou encore dans les fluides des cavités péritonéale ou pleurale (Aceto et al., 2014; Giuliano et al., 2015).

Les contraintes de cisaillement imposées par les flux peuvent également servir d'information directionnelle aux cellules adhérentes, via des molécules sensibles à ce stress mécanique. Ces senseurs incluent les adhésions focales (et les intégrines), les récepteurs couplés aux protéines G, les canaux à ions de type TRP (transient receptor potential), et le cil primaire (Vasilyev and Drummond,

2010). En conséquence, les cellules migratrices peuvent bouger avec ou contre le flux (Hsu et al., 2005; Vasilyev et al., 2009).

f. L'électrotaxie

L'électrotaxie, aussi connue comme la galvanotaxie, est définie comme la migration cellulaire dirigée par un courant ou un champ électrique, s'orientant selon le type cellulaire vers l'anode ou la cathode (Cortese et al., 2014; Liu and Song, 2014; Wu and Lin, 2014). Les champs électriques peuvent ouvrir les canaux voltages dépendants à ions Ca^{2+} et Na^+ , provoquant des flux d'ions intracellulaires et activant de nombreuses voies en aval (Na/K-ATPase, NHE3 et polarisation cellulaire (Liu and Song, 2014; Zhao, 2009)). De plus, les récepteurs de surface impliqués dans la migration, comme l'EGFR, l'AchR (acetylcholine receptor) et les intégrines sont décrits comme répondant aux champs électriques et activent localement les voies PI3K/AKT et MAP/ERK (Cohen et al., 2014; Liu and Song, 2014).

L'électrotaxie a différents effets incluant la stimulation de la migration de nombreux types cellulaires comme les fibroblastes, les cellules épithéliales et endothéliales, les neurones, les cellules immunitaires et les cellules cancéreuses (Cortese et al., 2014). L'électrotaxie supporte la régénération des tissus, les épithéliums blessés induisant un gradient de faibles courants électriques qui déclenche la migration à l'intérieur de l'espace ouvert pour favoriser la fermeture de la blessure (Zhao et al., 2006). Outre l'épithélium lui-même, les cellules endothéliales et neuronales sont aussi impliqués dans la régénération (Zhao, 2009; Zhao et al., 2006). Cliniquement, la stimulation électrique des tissus est parfois utilisée pour favoriser la guérison (Torkaman, 2014; Zhao, 2009).

D. Intégrines et Cancers

Classiquement, la littérature sur le cancer a tendance à impliquer les intégrines dans la prolifération tumorale, la migration et la survie. Ce rôle des intégrines dans la migration cellulaire et l'invasion est l'un des domaines les plus étudiés de la biologie des tumeurs (Desgrosellier and Cheresch, 2010; Seguin et al., 2015), notamment dans le mélanome

Figure 42 : Les intégrines impliquées dans le cancer

Adapté de (Desgrosellier and Cheresch, 2010)

Type de cancer	Intégrines exprimées	Phénotypes associés
Mélanome	$\alpha v\beta 3$ et $\alpha 5\beta 1$	Phase verticale de croissance et métastases lymphatiques.

Sein	$\alpha 6\beta 4$ et $\alpha v\beta 3$	Croissance de la tumeur, augmentation de grade et baisse de la survie ($\alpha 6\beta 4$). Augmentation des métastases osseuses ($\alpha v\beta 3$).
Prostate	$\alpha v\beta 3$	Augmentation des métastases osseuses.
Pancréas	$\alpha v\beta 3$	Métastases lymphatiques.
Ovaires	$\alpha 4\beta 1$ et $\alpha v\beta 3$	Augmentation des métastases péritonéale ($\alpha 4\beta 1$) et prolifération tumorale ($\alpha v\beta 3$).
Cervical	$\alpha v\beta 3$ et $\alpha v\beta 6$	Baisse de la survie des patients.
Glioblastome	$\alpha v\beta 3$ et $\alpha v\beta 5$	Exprimés à la marge tumeur-tissus normaux, rôle possible dans l'invasion
Carcinome du poumon non à petites cellules	$\alpha 5\beta 1$	Baisse de la survie des patients.
Colon	$\alpha v\beta 6$	Baisse de la survie des patients.

Outre les spécificités de liaisons aux protéines structurales vues précédemment, les intégrines sont capables de lier de nombreuses protéines matricielles ou des jonctions cellule-cellule.

Figure 43 : Spécificités de ligand des couples d'intégrines

Adapté de (Eble and de Rezende, 2014; Gagen et al., 2014)

Intégrines	Ligands
$\alpha 1\beta 1$	Collagènes (I, IV, IX), laminine, galectine-8
$\alpha 2\beta 1$	Collagènes (I, IV, IX), laminine, Cadhérine E, trombospondine-1, ténascine-C
$\alpha 3\beta 1$	Laminine, trombospondine-1, galectine-8
$\alpha 4\beta 1$	Fibronectine, VCAM-1, ICAM-4, MAdCAM-1, trombospondine-1, ostéopontine, ADAM2
$\alpha 5\beta 1$	Fibronectine, fibrilline, ostéopontine, trombospondine-1, galectine-8, ADAM (9, 12, 15, 23), SPARC
$\alpha 6\beta 1$	Laminine, trombospondine, ADAM (9, 12, 15, 23)
$\alpha 7\beta 1$	Laminine
$\alpha 8\beta 1$	Fibronectine, vitronectine, ostéopontine, ténascine-C, néphronectine, LAP-TGF β
$\alpha 9\beta 1$	Fibronectine, ténascine-C, VEGF, VCAM-1, ostéopontine, ADAM (2, 9, 12, 15, 23)
$\alpha 10\beta 1$	Collagènes (I, IV, VI, IX), Laminine

$\alpha11\beta1$	Collagènes (I, IV, IX)
$\alpha\nu\beta1$	Fibronectine, vitronectine, LAP-TGF β , ostéopontine, ADAM (9, 12, 15, 23), galectine-8
$\alpha\nu\beta3$	Fibronectine, vitronectine, trombospondine (1, 2), collagène IV, CTGF, MMP-2, LAP-TGF β , ostéopontine
$\alpha\nu\beta5$	Fibronectine, vitronectine, LAP-TGF β , ostéopontine, ADAM (9, 12, 15, 23)
$\alpha\nu\beta6$	Fibronectine, LAP-TGF β , ostéopontine
$\alpha\nu\beta8$	Fibronectine, vitronectine, LAP-TGF β
$\alpha6\beta4$	Laminine
$\alpha4\beta7$	Fibronectine, VCAM-1, MAdCAM-1, ostéopontine
$\alpha E\beta7$	Cadhérine E
$\alpha D\beta2$	VCAM-1, ICAM-3
$\alpha L\beta2$	ICAM (1, 5)
$\alpha M\beta2$	Fibrine, ICAM (1, 2, 4)
$\alpha X\beta2$	Collagènes, fibrine, ICAM
$\alpha IIb\beta3$	Fibronectine, fibrine, vitronectine, trombospondine

1. Rôle des intégrines dans les cellules souches

Les cellules souches épithéliales jouent un rôle important dans la physiologie du développement, de la maintenance et du remodelage des organes et des tissus (Blanpain and Fuchs, 2014), ces propriétés étant associées à l'initiation et la progression des carcinomes (Visvader and Lindeman, 2012). Etant donné que la niche des cellules souches est extrêmement régulée par des signaux issus du microenvironnement matriciel, certaines intégrines sont impliquées dans la capacités des cellules souches à percevoir et répondre cette signalisation, aussi bien dans les tissus normaux que dans le contexte tumoral. De nombreuses intégrines ont été définies comme des marqueurs et régulateurs des cellules souches, suggérant de nouvelles approches thérapeutiques à développer ciblant le phénotype "souche" des cellules cancéreuses.

Des études récentes ont identifié des intégrines spécifiquement enrichies dans les cellules souches épithéliales et fortement impliquées dans leur comportement.

L'intégrine $\beta1$ est fortement exprimée dans les cellules souches normales et régule leur biologie dans de nombreux organes. Typiquement, les cellules souches sont associées à un microenvironnement particulier lui fournissant des signaux essentiels à son auto-renouvellement et à sa pluripotence. Par exemple, les protéines matricielles comme la périostine et la ténascine C sont retrouvées dans les niches de cellules souches (Malanchi et al., 2012; Oskarsson et al., 2011).

D'autres preuves renforcent l'importance de $\beta 1$ dans le maintien de la niche "souche", conservant une population de cellules souches stables et contrôlant la balance entre auto-renouvellement et différenciation (Taddei et al., 2008). Dans l'épiderme, le follicule pileux crée une niche de cellules musculaires lisses par l'expression de l'intégrine $\alpha 8\beta 1$ (Fujiwara et al., 2011). La signalisation intégrine est également impliquée dans la prolifération et la différenciation des cellules souches épithéliales cutanées, où l'intégrine $\beta 1$ augmente l'adhésion des kératinocytes et l'intégrine $\alpha \beta 6$ active le TGF β (Rognoni et al., 2014). De plus, la MT1-MMP active une voie de signalisation intégrine $\beta 1$ / RhoGTPase qui régule en cascade la forme des cellules souches en contrôlant le lignage des cellules souches squelettiques (Tang et al., 2013). Dans les cellules souches intestinales, la perte de l'intégrine $\beta 1$ augmente la prolifération épithéliale, suggérant que l'expression de $\beta 1$ peu limiter la prolifération des cellules souches (Jones et al., 2006). Evidemment, l'adhésion dépendante des intégrines à la lame basale induit une polarité cellulaire intrinsèque, résultant en une division asymétrique, qui permet au final la maintenance des cellules souches et la génération de cellules différenciées (Goulas et al., 2012). Dans la glande mammaire, le microenvironnement contrôle le comportement des cellules épithéliales et progénitrices (Kessenbrock et al., 2013), les intégrines étant des marqueurs importants permettant d'identifier ces types cellulaires. Les lignages épithéliaux émergent des même précurseurs dans le sein et peuvent être séparés selon leur profils d'expression des intégrines : les cellules luminales expriment de bas niveaux des sous-unités $\alpha 6$ et $\beta 1$, alors que les cellules de la lame basale, incluant les cellules souches mammaires, en expriment de hauts niveaux (Shackleton et al., 2006; Stingl et al., 2006; Visvader, 2009). De plus, des études fonctionnelles ont démontré que la sous-unité $\beta 1$ est essentielle pour le maintien du potentiel régénératif de la glande mammaire adulte (Taddei et al., 2008).

Les niveaux d'expression de l'intégrine $\beta 3$ permettent de distinguer les progéniteurs luminaux mammaires ($\beta 3+$) des cellules luminales matures et différenciées ($\beta 3-$) (Asselin-Labat et al., 2007). Il a également été mis en évidence qu'une voie de maintien de l'état souche passant par $\alpha \beta 3$ est importante pour le remodelage physiologique des cellules souches adultes, le TGF $\beta 2$ induisant l'expression de l' $\alpha \beta 3$ dans les cellules souches mammaires durant la grossesse pour stimuler l'expansion mammaire, la clonogénicité et l'expression du régulateur Slug (Desgrosellier et al., 2014). Alors que les souris vierges dépourvues d' $\alpha \beta 3$ développent des glandes mammaires normales, le remodelage mammaire au cours de la grossesse se révèle défectueux. Cette voie peut être empruntée aux cours du cancer du sein, l' $\alpha \beta 3$ contribuant aux propriétés des cellules souches cancéreuses telles l'initiation tumorale (Desgrosellier et al., 2014) et les métastases (Desgrosellier et al., 2009).

Ces exemples illustrent la capacité des intégrines à influencer le comportement des cellules souches dans le maintien et le remodelage des tissus normaux, rôle pouvant être conservé dans les cellules initiatrices de tumeurs.

2. Les intégrines et l'initiation tumorale

a. La régulation des intégrines dans les cellules initiatrices de tumeurs

De plus en plus de preuves suggèrent qu'un faible nombre de cellules initiatrices de tumeurs sont présentes au sein des tumeurs hétérogènes, formant une sous-population capable de s'auto-renouveler et moteur de la tumorigénèse, et cela dans de nombreux types de cancers. Aussi appelées CSCs (Cancer Stem Cells), les cellules initiatrices de tumeurs dirigent la progression tumorale, la résistance aux drogues et les rechutes (Visvader and Lindeman, 2012).

Si les intégrines sont bien connues pour leur contribution à la progression tumorale, il n'est pas encore clair si ces effets sont reliés à leur rôle dans les CSCs. Plusieurs intégrines sont similairement enrichies entre les cellules souches adultes et progénitrices, et les CSCs, telles que les sous-unités $\alpha 6$, $\beta 1$ et $\beta 3$ (Medema, 2013). Parmi elles, l' $\alpha 6$ est la plus communément observée, étant enrichie dans les CSCs du sein (Martin and Jiang, 2014), de la prostate (Hoogland et al., 2014), du carcinome squameux (Schober and Fuchs, 2011) et du cancer colorectal (Haraguchi et al., 2013). Des études récentes ont également caractérisé la sous-unité $\beta 4$ comme un nouveau marqueur du cancer du poumon, où elle est impliquée dans l'auto-renouvellement, la propagation tumorale et la résistance aux chimiothérapies (Zheng et al., 2013). Ainsi, les différences d'expression de surface des intégrines peuvent identifier les petites sous-populations les plus agressives et dangereuses au sein des tumeurs.

Outre servir comme marqueurs des CSCs, des preuves suggèrent que les intégrines participent aussi à leur fonction.

Dans le glioblastome, affecter la fonction de l'intégrine $\alpha 6$ supprime le phénotype CSC, prouvant l'importance de cette sous-unité dans le maintien des cellules souches de ce cancer (Lathia et al., 2010). L'intégrine $\alpha 6$ contribue aussi à l'initiation du cancer de sein en régulant l'induction de BMI-1 par FAK, qui est nécessaire pour l'auto-renouvellement cellulaire cancéreux (Goel et al., 2013). En fait, deux variants d'épissages de l'intégrine $\alpha 6$ provoquent deux phénotypes opposés. Alors que le variant $\alpha 6A$ induit un phénotype épithélial, le variant $\alpha 6B$ est essentiel à l'établissement

du phénotype mésenchymateux "type souche" (Goel et al., 2014). De manière intéressante, ces variants diffèrent seulement au niveau de la queue cytoplasmique de l' $\alpha 6$.

Pour ce qui est de la sous-unité $\beta 4$, simplement invalider son domaine de signalisation bloque les capacités de CSCs des cellules cancéreuses de la prostate, sans impacter le développement des cellules normales (Yoshioka et al., 2013). De plus, l'intégrine $\beta 3$ est nécessaire et suffisante pour induire le phénotype CSC dans les cancers du sein (Desgrosellier et al., 2014; Lo et al., 2012), du pancréas (Seguin et al., 2014) et du poumon (Seguin et al., 2014). Ainsi, cibler la capacité de ces intégrines spécifiques à moduler l'adhésion cellulaire, mécanisme important pour les CSCs, en manipulant l'interaction intégrines/matrice peut représenter une stratégie thérapeutique pour supprimer la fonction des CSCs.

b. La voie non-canonique indépendante des ligands

Figure 44 : Signalisation canonique et non-canonique des intégrines

Plusieurs études montrent que les intégrines peuvent influencer les CSCs indépendamment de leur capacité à interagir avec la matrice extracellulaire.

Dans les cancers du poumon et du pancréas, l'intégrine $\alpha \beta 3$ s'agrège à la surface des cellules poussant en suspension, sans aucun lien physique aux ligands de la matrice. Cette agrégation est médiée par une interaction de la Galectine 3 avec $\alpha \beta 3$ indépendamment de son domaine de liaison au ligand, qui induit le recrutement de KRAS et mène à l'acquisition du phénotype "souche" (Seguin et al., 2014). Traiter ces cellules avec des antagonistes de compétition avec le ligand ou l'expression d'intégrine mutante pour le site de liaison n'empêche pas l' $\alpha \beta 3$ de provoquer le phénotype "souche". Cet exemple suggère que les cellules tumorales peuvent utiliser les intégrines indépendamment de leur rôle de récepteurs d'adhésion pour stimuler leur survie dans des environnements non-permissifs, comme lors de l'initiation tumorale ou de la dissémination métastatique dans des microenvironnement non-modifiés.

Pour le cas de l' $\alpha \beta 3$, ces fonctions indépendantes de l'adhésion déclenchent une voie de signalisation distincte de la voie RAS et du lien au cytosquelette. L'expression d' $\alpha \beta 3$ est nécessaire et suffisante pour induire la métastase des cellules cancéreuses par le recrutement et l'activation par la $\beta 3$ de la kinase Src, indépendamment de FAK ou de la voie MEK/ERK (Desgrosellier et al., 2009). De plus, seule une $\alpha \beta 3$ non-associée à un ligand peut former un complexe avec KRAS pour recruter la protéine TBK1, liée à Ras, et stimuler l'activité de NF κ B (Seguin et al., 2014). Ainsi, si l'activation de la famille RAS est provoquée par un signal issu de plusieurs intégrines, il devient clair que cette signalisation intégrine est diverse et dépendante du contexte, avec certaines intégrines capable

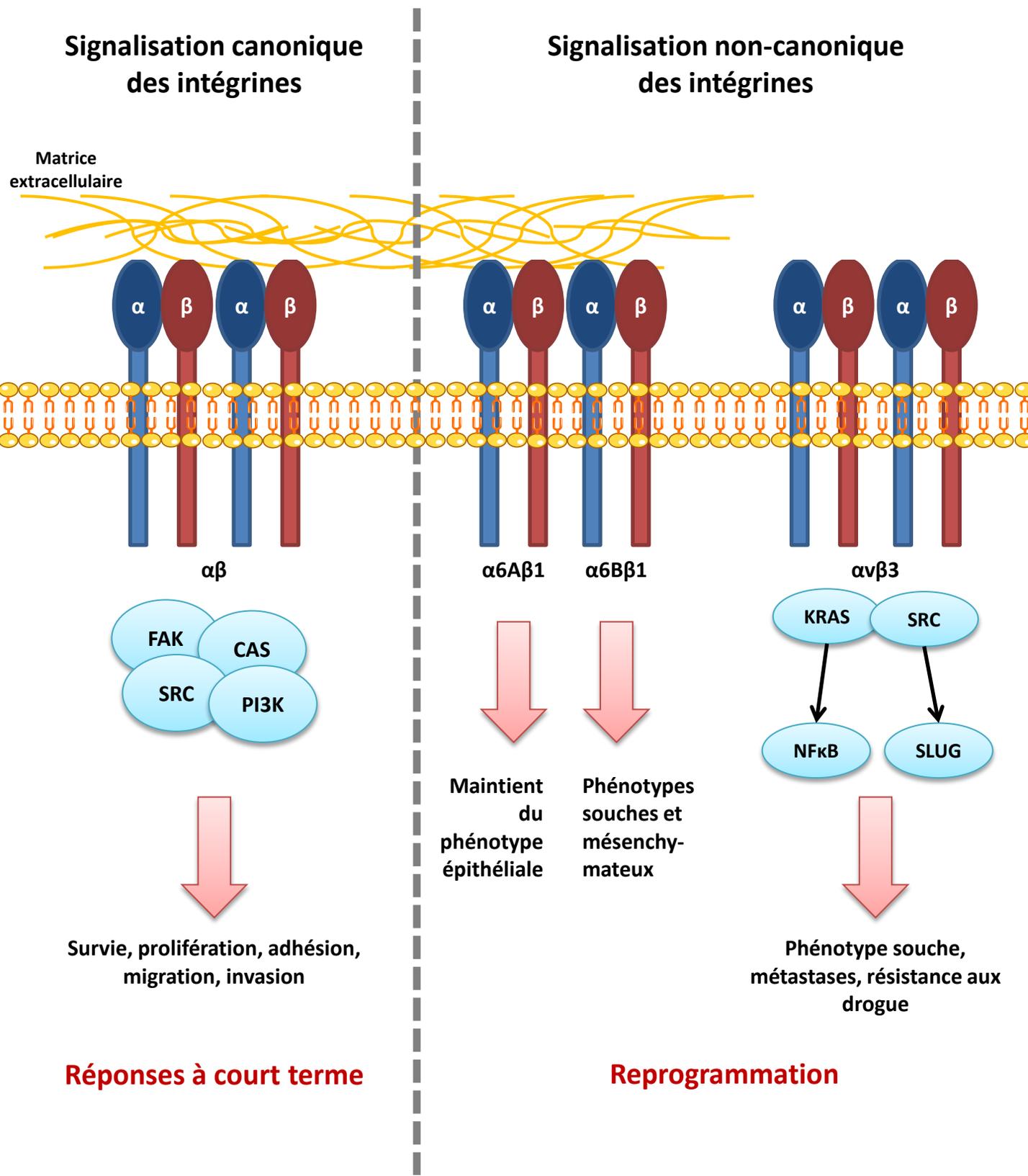


Figure 44 : Signalisation canonique et non-canonique des intégrines

Adaptée de Seguin et al., 2015

d'induire une reprogrammation rapprochant des cellules souches. Alors que ces fonctions des intégrines sont primordiales au cours du développement, leur détournement par les CSCs leur permet de survivre et de transiter par des endroits inappropriés qui exacerbent les métastases et la progression tumorale, rendant les tumeurs hautement résistantes aux thérapies incapables de cibler cette sous-population.

3. Rôle des intégrines dans la propagation métastatique

Le processus métastatique a plusieurs étapes qui requièrent que la cellule cancéreuse échappe à la tumeur primaire, survive dans la circulation et colonise des sites à distance puis prolifère. Comme les intégrines peuvent influencer sur nombre de ces étapes, il n'est pas surprenant que l'augmentation d'expression de certaines intégrines dans la tumeur primaire soit associée à un mauvais pronostic et une augmentation du potentiel métastatique de nombreux cancers (Desgrosellier and Cheresch, 2010). Cette augmentation d'expression peut refléter un grand nombre de CSCs avec un enrichissement de certaines intégrines (Medema, 2013), et peut expliquer pourquoi certaines tumeurs progressent alors que d'autres non. De plus, l'expression des intégrines dans les CSCs et les autres cellules tumorales peut être induite par le microenvironnement (Finger and Giaccia, 2010; Ziaee and Chung, 2014), résultant en l'augmentation de la signalisation intégrine qui stimule les différentes étapes responsables de la progression métastatique.

a. L'invasion locale

La phase initiale de la dissémination tumorale depuis le site primaire implique de nombreux signaux pouvant être modulés par plusieurs intégrines (Desgrosellier and Cheresch, 2010; Weis and Cheresch, 2013). Au cours de l'invasion locale, une cellule cancéreuse utilise des mécanismes de migration similaire par exemple aux cellules embryonnaires, acquérant la capacité de s'étendre à travers les tissus et d'envahir la matrice extracellulaire. Cette transition de type épithélio-mésenchymateuse (EMT) est essentielle durant le développement et empruntée au cours de la transformation tumorale. Ce mécanisme impliquant la dissociation des jonctions cellules-cellules, la réorganisation du cytosquelette et l'acquisition de marqueurs mésenchymateux (Lamouille et al., 2014), les intégrines jouent donc un rôle de premier plan au cours de cette transition survenant entre les phases RGP et VGP du mélanome (Haass et al., 2005).

Il a été rapporté que de hauts niveaux d' $\alpha v \beta 6$ dans le cancer du colon réduisent la survie médiane des patients comparé aux cancers avec peu d' $\alpha v \beta 6$ (Bates et al., 2005). Il a ainsi été suggéré

une activation du TGF β 1 dépendante d' α v β 6, qui en conséquence potentialise l'EMT (Khan and Marshall, 2016).

La diminution d'expression de la sous-unité β 1 dans le cancer du sein supprime la croissance tumorale mais augmente les métastases au poumon (Truong et al., 2014). Dans des matrices 3D *in vitro*, l'inhibition de β 1 par anticorps bloquant ou suppression génétique provoque le passage d'une migration collective en une migration de cellules indépendantes, ceci étant dépendant de l'augmentation de la voie du TGF β 1 et corrélé à la perte de la cadhérine E. La suppression du TGF β 1 ou la réexpression de la cadhérine E restaure la migration collective dans les cellules déficientes pour β 1, réduisant leur potentiel métastatique (Truong et al., 2014).

Parfois, la stimulation de la voie du TGF par les intégrines est indirecte. Il a ainsi été montré que l' α v β 3 augmentait l'EMT induite par le TGF β 1 dans les cellules mammaires MCF10A en liant directement le FGF1 et le rendant accessible aux récepteurs FGFR1 (Mori et al., 2015). Cet engagement entre α v β 3 et le FGF1 et la signalisation du FGFR1 sont nécessaires pour induire l'EMT. Le TGF β 1 peut également augmenter l'expression et la sécrétion de la fibuline 5, une glycoprotéine porteuse d'un motif RGD et capable de se lier aux intégrines α 5 β 1, α v β 3 et α v β 5 (Yanagisawa et al., 2009). La fibuline 5 est exprimée durant le développement et est seulement ré-exprimée dans les tissus blessés les cellules subissant une EMT. De plus, la fibuline 5 stimule l'expression et l'activité des MMP-2 et 9, et augmente l'invasion des cellules épithéliales mammaires probablement par l'augmentation de Twist et la diminution de la cadhérine E. Cependant le lien direct entre la fibuline 5 et les intégrines au cours de l'EMT reste à être formellement établi (Lee et al., 2008).

Il a également été montré que des mutations de la protéine p53 pouvait contribuer au développement des cancers, favorisant un phénotype invasif et la formation de métastases *in vivo* par l'induction du recyclage des intégrines dépendant de RCP, promouvant la signalisation et le trafic des récepteurs aux facteurs de croissance (Muller et al., 2009). Ceci peut stimuler la migration et l'invasion, la réponse précise vis à vis du mutant de p53 dépendant du contexte cellulaire. Ainsi, si la mutation de p53 peut dans certains cas affecter négativement la survie cellulaire (Brosh and Rotter, 2009), elle peut dans d'autres participer à la progression tumorale (Muller et al., 2009).

b. Survie en suspension dans le flot sanguin

Les cellules normales dépendent des intégrines pour relayer la stimulation de la matrice extracellulaire, assurant ainsi le maintien de l'intégrité de l'organe et prévenant les cellules de s'égarer dans d'autres tissus. Alors que les cellules tumorales montrent une certaine indépendance vis à vis de leur support, leur détachement de la matrice peut induire la mort cellulaire. Une fois que

les cellules tumorales échappent au site primaire et intravasent dans les vaisseaux sanguins ou lymphatiques, elles doivent s'adapter pour survivre à l'absence d'adhésion à une matrice.

De plus en plus de preuves indiquent que les intégrines ont un rôle central dans le contrôle de la croissance et de la survie dans ces conditions indépendantes de l'ancrage à la matrice, une propriété critique pour la formation de métastases. Par exemple, l'intégrine $\beta 1$ stimule la croissance indépendante de l'adhésion dans les cancers de la prostate (Schooley et al., 2012) et du sein (Cagnet et al., 2014) en activant une cascade FAK/PAK/MAPK, alors que l'intégrine $\beta 3$ interagit avec c-Src indépendamment de la signalisation de FAK pour favoriser l'indépendance à l'ancrage matriciel et les métastases lymphatiques dans ces deux modèles (Desgrosellier et al., 2014).

Ce paradigme de croissance indépendante de l'adhésion via les intégrines pourrait être expliqué en partie par la capacité d'intégrines spécifiques à former des agrégats membranaires en réponse aux facteurs de croissance et d'oncogènes, transmettant ainsi une signalisation pro-survie (Seguin et al., 2014; Shin et al., 2013).

c. Colonisation de la niche métastatique

La colonisation métastatique d'organes à distance requiert la survie cellulaire et l'expansion des cellules cancéreuses à chaque site secondaire. Ce processus n'est accompli avec succès que pour peu de cellules cancéreuses atteignant l'organe en question, implantant une "niche métastatique" qui a besoin d'une interaction spécifique entre les cellules cancéreuses et la matrice environnante. Étant donné que le panel d'intégrines exprimé par chaque cellule tumorale dicte la capacité de cette cellule à répondre à une niche particulière et à initier la colonisation métastatique, les intégrines doivent jouer un rôle important dans l'acclimatation des cellules tumorales au microenvironnement de chaque organe pour promouvoir la formation des métastases.

La tendance à métastaser a récemment été reliée à l'accumulation de certaines protéines matricielles à l'intérieur d'une niche métastatique donnée. Le ténaïcine C est un ligand des intégrines $\beta 1$ et $\beta 3$ produit dans la niche métastatique pulmonaire et est corrélée à un mauvais pronostic dans le cancer du sein (Oskarsson et al., 2011). La périostine est un ligand d' $\alpha V\beta 3$ et $\alpha V\beta 5$ qui est enrichi dans les métastases lymphatiques du cancer du sein (Malanchi et al., 2012). Les cellules de cancer du sein expriment L1-CAM (L1 cell adhesion molecule), un ligand de $\alpha V\beta 3$ qui est requis pour la formation de métastases au poumon, permettant aux cellules tumorales de se lier et extravaser à travers l'endothélium pulmonaire (Zhang et al., 2012a).

La protéine VCAM1 (vascular cell adhesion molecule 1) dirige la propagation métastatique des cellules tumorales au ganglion lymphatique, permettant la liaison à l'intégrine $\alpha 4\beta 1$ exprimée par les cellules endothéliales ganglionnaires. Le remodelage des ganglions par la voie VEGF/PI3K active

$\alpha 4\beta 1$ de l'endothélium, qui à son tour sert de ligand adhésif pour les cellules tumorales positives pour VCAM1 (Garmy-Susini et al., 2013). Comme la liaison de $\alpha 4\beta 1$ à VCAM1 contribue également à l'arrêt dans la vaisseau et à l'extravasation des cellules de lymphomes et de mélanome au poumon et à la rate, cette liaison dépendante des intégrines est une cible potentielle de thérapie anticancéreuse (Schlesinger and Bendas, 2015). Similairement, les intégrines $\alpha \nu\beta 3$, $\alpha 2\beta 1$ et $\alpha 4\beta 1$ jouent des rôles majeurs dans les métastases osseuses, leurs ligands parmi les protéines matricielles étant naturellement exprimées dans les cellules des tissus osseux : $\alpha \nu\beta 3$ liant l'ostéopontine, tandis que $\alpha 2\beta 1$ et $\alpha 4\beta 1$ se lient au collagène de type 1 de la matrice osseuse et VCAM1 aux cellules endothéliales osseuses (Esposito and Kang, 2014).

Ces exemples présentent la complexité des liaisons intégrines/ligands qui gouvernent comment et où les cellules tumorales circulantes forment de nouvelles micro métastases. Une fois implantées à l'intérieur d'une niche appropriée, les cellules tumorales s'adaptent à nouveau pour permettre leur survie et leur prolifération. L'intégrine $\beta 1$ engendre des protrusions semblables à des filopodes qui supportent l'interaction initiale entre les cellules cancéreuses ayant extravasés avec les composants matriciels locaux, ce qui aide les cellules à induire les voies de signalisation dépendantes de l'adhésion incluant l'activation de FAK, qui phosphoryle ensuite ERK et menant à la prolifération rapide de ces cellules à l'intérieur du tissu hôte (Shibue et al., 2012; Shibue and Weinberg, 2009). Il est aussi probable que les intégrines, qui supportent la croissance indépendante de l'ancrage à la matrice et qui avantagent les cellules tumorales circulantes, auront moins d'importance pour la dernière étape de l'implantation de métastases lorsque la croissance dépendante de l'adhésion prévaut. Cependant, il est important de noter qu'une seule intégrine peut réguler plusieurs aspects différents de la progression tumorale. Par exemple, l'intégrine $\alpha \nu\beta 3$ non-liée à son ligand augmente la reprogrammation des cellules cancéreuses vers un état "souche", alors que cette même $\alpha \nu\beta 3$ associée à son ligand peut produire une signalisation issue de la matrice induisant l'invasion et la prolifération.

L'éducation de la niche métastatique par les cellules cancéreuses est également réalisée par les exosomes dérivés des tumeurs. Les exosomes sont ainsi porteurs de nombreuses intégrines, distinctes du répertoire des cellules tumorales d'origines, et qui dictent leur spécificité d'adhésion à certains types cellulaires et molécules de la MEC (Hoshino et al., 2015). Notamment, les exosomes exprimant l'intégrine $\alpha \nu\beta 5$ se lient spécifiquement aux cellules de Kupffer, leur conférant un tropisme hépatique, alors que l'intégrine $\alpha 6\beta 1$ leur permet d'adhérer aux fibroblastes et aux cellules épithéliales pulmonaires, responsable du tropisme au poumon.

d. Rôles dans la néo-angiogenèse

$\alpha V\beta 3$ et $\alpha V\beta 5$ participent à la progression tumorale par leur rôle dans l'angiogénèse mais également dans les métastases (Robinson and Hodivala-Dilke, 2011). L'hypoxie peut déclencher le "switch angiogénique" dans les tumeurs dormantes (Bergers and Benjamin, 2003), induisant la sécrétion de facteurs de croissances comme le VEGF. En conséquence, les cellules progénitrices endothéliales angiogéniques sont recrutées de la moelle osseuse au stroma tumoral. Les cellules endothéliales sont capturées par la matrice tumorale riche en vitronectine et fibronectine et contribuent ainsi à la formation de nouveaux vaisseaux sanguins, alimentant la tumeur en oxygène et en nutriments (Weis and Cheresh, 2011b).

4. Intégrines et résistance thérapeutique

a. Rôle des intégrines dans la résistance thérapeutique

Malgré les avancées en terme de traitement anticancéreux, de nombreuses thérapies sont limitées par le développement de résistances issues de nombreux facteurs, incluant l'altération des cibles thérapeutiques, l'activation de voies de signalisation pro-survie et l'inhibition de la mort cellulaire. La résistance aux thérapies peut être divisée en deux catégories, la résistance innée dérivé de facteurs génétiques ou environnementaux préexistant dans la tumeur, ou la résistance acquise résultant d'une réponse adaptative via l'activation de voies alternatives et la sélection de sous-populations résistantes (voir partie I.D.5).

La CAM-DR (cell adhesion-mediated drug resistance) est un programme pro-survie et anti-apoptotique, et dirigé par l'interaction intégrines/matrice extracellulaire (Damiano, 2002). Cette stratégie d'évasion permet de sélectionner les cellules exprimant certains types d'intégrines et/ou les cellules capable d'induire l'expression des gènes des intégrines. Par exemple, l'intégrine $\beta 1$ a été impliquée comme moteur de la résistance aux radiothérapies dans les cancers de la tête et du cou (Eke et al., 2012), la résistance des cancers du sein au Lapatinib et Trastuzumab (Huang et al., 2011), et la résistance du cancer du poumon à l'Erlotinib (Kanda et al., 2013). Dans les cancers du poumon, l'Erlotinib augmente l'expression des sous-unités $\beta 1$, $\alpha 2$ et $\alpha 5$, favorisant l'adhésion cellulaire, alors que l'extinction de $\beta 1$ restaure la sensibilité à l'Erlotinib en réduisant l'activité de SRC et d'AKT, impliquant une signalisation $\beta 1$ /SRC en médiateur clef de la résistance acquise aux thérapies ciblant l'EGFR (Kanda et al., 2013). Dans la leucémie myéloïde chronique, les patients traités à l'imatinib développent au cours du temps un résistance au traitement, corrélée à une transition de type EMT des cellules cancéreuses et une augmentation des protéines d'adhésions, notamment l'intégrine

$\alpha\beta 3$ qui active la voie ERK (Puissant et al., 2012). L'inhibition de l'intégrine $\alpha\beta 3$ ou de la voie ERK rétablit la sensibilité à l'imatinib.

Il a également été montré que de multiples intégrines contribuaient coopérativement à la résistance aux drogues. Les cellules de carcinomes ovariens attachés à la matrice tolèrent l'inhibition de la voie PI3K/mTOR en induisant une réponse adaptative pro-survie, qui peut être bloquée par l'inhibition simultanée des intégrines $\beta 1$ et $\beta 4$, ILK et FAK (Mouneimne et al., 2012).

Des preuves indiquent également que la matrice extracellulaire peut directement moduler la sensibilité des cellules aux thérapies. Toujours dans le cancer des ovaires, le TGF β associé à la matrice rend les cellules sensibles à la mort cellulaire induite par le Paclitaxel par une voie FAK/Rho via sa liaison à l'intégrine $\alpha\beta 3$ (Tumbarello et al., 2012).

L'implication des intégrines dans l'adoption du phénotypes des CSCs est probablement une contribution supplémentaire à la chimiorésistance et à la rechute tumorale. Dans le cancer du sein, une population de CSCs exprimant fortement l'intégrine $\alpha 6$ est retrouvée enrichie après un traitement au Taxol (Goel et al., 2014). Bien que plusieurs études suggèrent que les CSCs sont enrichies après les thérapies cancéreuses, ce phénotype n'a pas été confirmé dans des modèles murins de tumorigenèses spontanées ou dans les cancers humains. Il a été démontré que les CSCs exprimant l'intégrine $\beta 4$ sont enrichies après un traitement au cisplatine dans le modèle de cancer des poumons spontané KRAS^{G12D};Tp53^{fl/fl} (Zheng et al., 2013). L'intégrine $\beta 3$ est également impliquée dans la résistance intrinsèque et acquise à l'Erlotinib et au Lapatinib, cette intégrine est hautement exprimée dans la résistance acquise aux inhibiteurs de l'EGFR où elle induit une voie dépendante de NF κ B (Seguin et al., 2014).

b. Le ciblage thérapeutique des intégrines

Ensemble, ces découvertes indiquent que plusieurs intégrines jouent un rôle dans la résistance aux drogues anticancéreuse, possiblement via un comportement de type CSC. L'implication des intégrines dans la résistance thérapeutique peut aussi dépendre de la modulation de la réponse immunitaire. De nombreuses drogues induisent une réponse aux dommages à l'ADN qui augmente l'expression de l'intégrine $\alpha\beta 3$ des cellules tumorales lors de leur acquisition de la résistance, et ces cellules tumorales résistantes étant plus facilement phagocytées par les cellules dendritiques pour supprimer la réponse immunitaire (Jinushi et al., 2012). Inversement, les anticorps monoclonaux qui bloquent l'adhésion des intégrines peuvent également servir à stimuler la réponse immunitaire. Par exemple, quand les tumeurs expriment fortement l'intégrine $\beta 3$, les thérapies systémiques à base d'anticorps anti- $\alpha\beta 3$ LM609 provoquent l'activation des mécanismes de défenses et déclenchent la

cytotoxicité dépendante des anticorps (Mulgrew et al., 2006). Comprendre comment ces cellules tumorales sont reconnues par le système immunitaire peut mener à des nouvelles stratégies thérapeutique pour combattre la résistance aux drogues.

De plus, affecter la fonction des intégrines pour traiter le cancer est une approche de plus en plus étudiée, que ce soit par la synthèse de peptides ou d'anticorps humanisés qui interfèrent avec l'interaction intégrine/ligand. Indépendamment des succès encourageant *in vitro* et des résultats pré-cliniques, les essais cliniques ont jusqu'à présent étaient relativement décevants (Desgrosellier and Cheresch, 2010). L'essai récent PODEIDON (NCT01008475) n'a montré aucune amélioration pour les patients souffrant de cancer colorectal métastatique K-RAS sauvage traités au abituzulab (anticorps anti intégrine αv) (Elez et al., 2015). Similairement, un essai de phase 3 combinant le cilengetide, un antagoniste des intégrines, avec une radiothérapie ne montre aucune amélioration des patients atteints d'un glioblastome (NCT00689221), et le développement de la drogue pour le traitement du cancer a été stoppé (Stupp et al., 2014). Etant donné la complexité du fonctionnement des intégrines et de leur dialogue avec les facteurs de croissances, il est possible qu'affecter les molécules en aval de la signalisation intégrine, plutôt que les intégrines elles-mêmes, serait une meilleure approche thérapeutique. Par exemple, plusieurs essais cliniques sont en cours ciblant deux effecteurs de la signalisation intégrine, les protéines kinases FAK (GSK2256098, PF04554878, VS-4718...) et SRC (dasatinib). Ces différents essais cliniques sont toujours en cours et apporteront plus d'informations dans le future (Hamidi et al., 2016).

RESULTATS

DISCUSSION

V. Résultats

A. Contexte et Objectifs de recherche

Figure 45 : SYK expression in melanocytes versus melanomas

Le mélanome est un cancer des plus sévères. Bien qu'il soit minoritaire comparé aux autres cancers cutanés, sa létalité est bien supérieure aux autres. Dérivant des mélanocytes, cellules dont l'activité physiologique est primordiale dans la défense de l'organisme contre les rayonnements de type U.V., leur transformation induit une prolifération locale et une capacité à métastaser à travers l'organisme. L'agressivité de ces métastases affecte directement les taux de survie des patients de mélanome. Cette agressivité est acquise tout au long de la transformation, au cours de laquelle les cellules tumorales accumulent des mutations et des modifications épigénétiques qui supportent le passage de cellules sédentaires au cycle régulé en cellules à la morphologie mésenchymateuses, proliférantes et invasives.

SYK, tyrosine kinase issue du gène du même nom, fait partie des protéines dont l'expression est altérée au cours du processus de transformation tumorale. De hauts niveaux de SYK sont essentiels à la survie des cellules cancéreuses dans de nombreuses pathologies (leucémies, lymphomes, rétinoblastome, cancers du poumon, du pancréas...), définissant l'expression de cette kinase comme oncogénique. Cependant, SYK peut également agir tel un suppresseur de tumeur, sa perte renforçant l'agressivité cancéreuse, et ce dans de nombreuses pathologies (cancers du sein, de la vessie, colorectaux, gastriques...) dont le mélanome.

Dans le cas du mélanome, l'expression endogène de SYK issue du mélanocyte original est perdue, et cela dans la vaste majorité des mélanomes primaires et des lignées cellulaires humaines (**Fig 45 a,b,c**). La perte de SYK au cours de la transformation tumorale, majoritairement suite à l'hyperméthylation de son promoteur (**Fig 45d**), est donc un événement récurrent qui pourrait participer à l'acquisition des propriétés prolifératives et/ou invasives des cellules de mélanome. Cependant, il n'est pas encore clairement établi si cet événement est "moteur" de la transformation ou seulement "passager".

Historiquement, l'équipe s'est depuis longtemps intéressée à la kinase SYK, au cours de collaborations et en son sein même, dans un premier temps essentiellement pour son rôle dans les cancers hématopoïétiques (Baudot et al., 2009; Couture et al., 1996; Deckert et al., 1998a; Deckert et al., 1996; Deckert et al., 1998b; Urzainqui et al., 2002; Williams et al., 1997), avant d'investiguer son implication dans la biologie du mélanome (Bailet et al., 2009). Il a ainsi pu être montré que la réexpression de SYK dans des cellules de mélanomes qui avaient perdu son expression induisait une

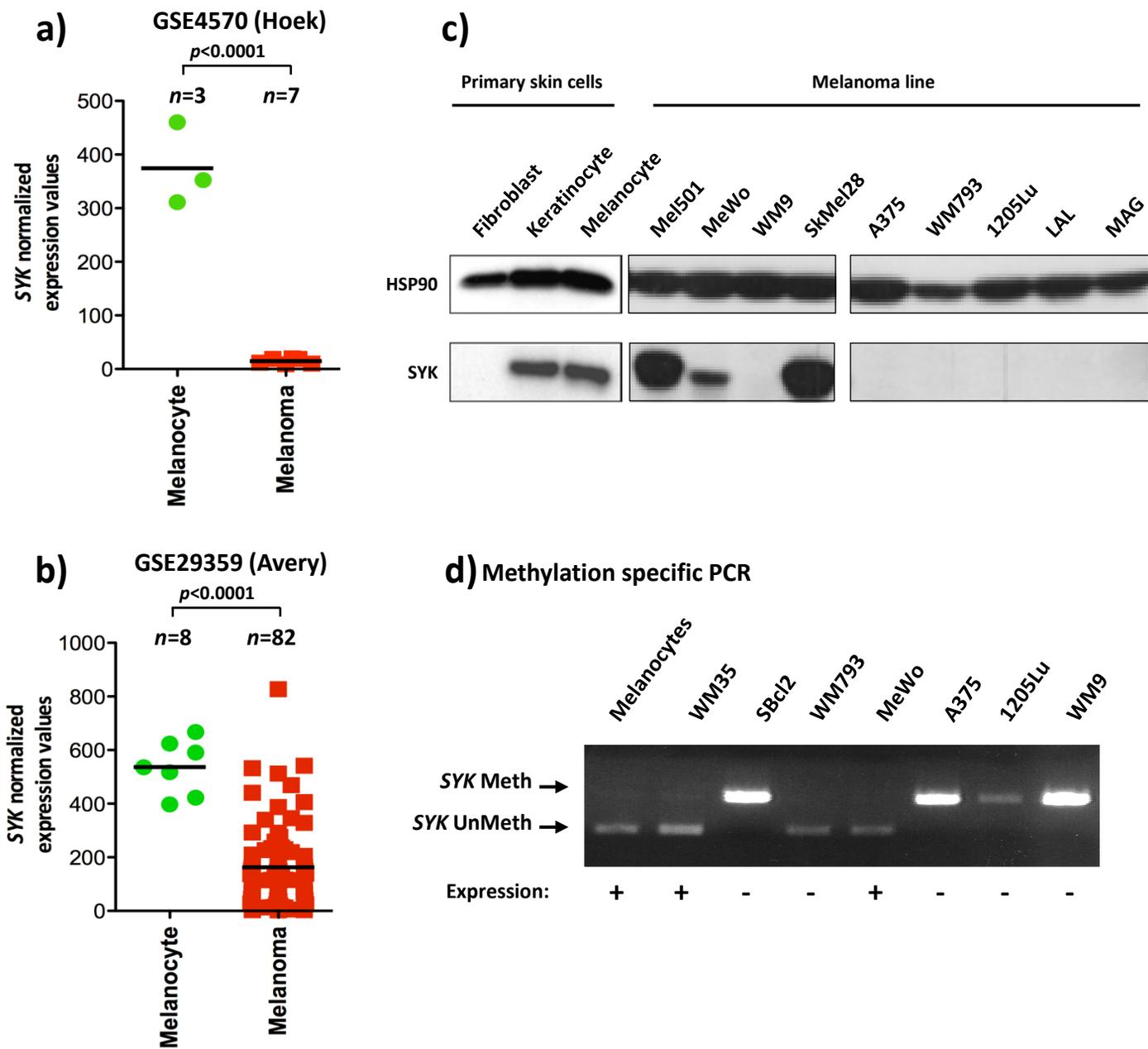


Fig 45 : SYK expression in melanocytes versus melanomas

Scatter plots show SYK expression across melanocytes versus melanomas within two publicly available data sets GSE4570 (a) and GSE29359 (b). *p*-values were calculated by two-tailed unpaired t test.

(c) SYK expression in human skin cells and melanoma lines; (d) Methylation specific PCR of SYK promoter in melanocyte and melanoma lines (from Bailet et al., 2009).

suppression tumorale par un processus de sénescence. Ce mécanisme est dépendant de p53 et provoque l'activation d'un programme de sénescences et de la voie p21, réduisant la prolifération et l'invasion cellulaire.

Au cours de ma thèse, j'ai utilisé l'approche inverse et ai étudié l'impact de l'extinction de SYK, dans les lignées de mélanome ayant conservé son expression et dans des modèles murins de KO conditionnels de *Syk*. Cette approche permet donc de mimer l'effet de la perte de SYK dans l'homéostasie mélanocytaire et dans la transformation tumorale afin de mieux en comprendre les conséquences. Mon travail s'est organisé en deux axes :

- Etudier *in vitro* et *in vivo* les conséquences cellulaires et moléculaires de l'extinction de SYK dans des lignées de mélanome. J'ai ainsi pu observer que la perte de SYK potentialise l'agressivité des mélanomes, favorisant un phénotype migratoire et invasif dans des expériences *in vitro* et augmentant la formation de métastases expérimentales chez la souris.
- Etudier l'impact de l'ablation conditionnelle de *Syk* dans le développement des mélanocytes *in vivo* et un modèle de mélanomagenèse induite par l'oncogène *Braf*^{V600E} et la perte du suppresseur de tumeur *Pten* chez la souris.

Ainsi, à l'issue de ma thèse, j'ai pu montrer que la perte de SYK induisait l'augmentation de la motilité, de l'adhésion, de la migration, de l'invasion et de la formation de métastases des cellules de mélanome. De même, si la perte de *Syk* seule ne semble pas impacter les mélanocytes cutanés dans leur développement, leur fonction de pigmentation ou de résistance aux UVs, l'ablation conditionnelle de *Syk* conjuguée à un fond oncogénique semble confirmer le rôle de SYK en tant que suppresseur de l'invasion du mélanome *in vivo*. Mes résultats sont présentés ci-après.

B. Abstract

Spleen tyrosine kinase (SYK) restrains melanoma metastasis through regulation of β 1 integrin function and EMT-like processes

Emilien Garcia¹, Christophe Girard¹, Mélanie Tichet¹, Moez Rathore¹, Aude Mallaviale¹, Damien Alcor¹, Lionel Larue², Sophie Tartare-Deckert¹, and Marcel Deckert¹

¹INSERM, U1065, Centre Méditerranéen de Médecine Moléculaire (C3M) and Université de Nice – Sophia Antipolis, Faculté de Médecine, Nice, France; ²CNRS UMR3347, INSERM, U1021, Institut Curie, Orsay, France.

The progression of tumors to metastatic disease involves the loss of metastatic suppressor functions. The propensity to metastasize is particularly high in melanoma, an aggressive skin cancer. Thus, aberrant cell migration is a key feature of melanoma progression, and is required for metastasis. Consequently, (epi)genetic changes dysregulating cell motility are important for melanoma malignancy. SYK (Spleen tyrosine kinase) is a cytoplasmic tyrosine kinase that has been implicated in tumor suppression of breast cancer and melanoma. In skin cells, SYK is found expressed by epidermal keratinocytes and melanocytes but absent in fibroblasts. In melanoma, SYK is frequently downregulated in melanocytes by epigenetic silencing and we showed previously that its loss has been associated with senescence escape. Whether it also regulates tumor cell migration and subsequent metastasis remains poorly understood. In this work we used gain- and loss-of-function approaches to analyze SYK's effects on metastatic abilities of human and murine melanoma cells. We found that reexpression of SYK or knockdown of SYK results in decreased or increased migration of melanoma cells, respectively. Notably, SYK knockdown cells displayed a mesenchymal-like phenotype with upregulation of mesenchymal markers such as fibronectin, SPARC and TWIST1. In addition, modulating SYK expression levels altered lung colonization potential of melanoma cells. Mechanistically, we found that silencing of SYK upregulates integrin β 1 activity that resulted in increased focal adhesion numbers, FAK-Src-paxillin signaling and enhanced melanoma cell adhesion and spreading. Interfering with β 1 integrin function and SPARC expression prevented enhanced adhesion and migration elicited by SYK knockdown. Our study unveils a novel role for SYK in suppressing integrin-mediated adhesion, a process that functions both as points of traction and as signaling platform during cell migration and outlines the importance of SYK inactivation in acquisition of a metastatic phenotype. In order to clarify the role of SYK and downstream signaling pathways in melanoma formation and progression, we have generated a conditional Syk KO mouse model in melanoma based on melanocyte-specific Pten loss and BrafV600E activating mutation. Preliminary results suggest that Syk loss does not accelerate Pten/Braf-driven melanoma formation but leads to deep invasion of Braf/Pten tumor cells into the dermis. Whether or not Syk inactivation affects the ability of Braf/Pten melanomas to metastasize is under investigation.

This work is supported by the Fondation ARC pour la Recherche sur le Cancer (PGA2011)

Keywords : Melanoma, integrin, adhesion, migration, SYK

C. Description des résultats

- **L'extinction de SYK dans le mélanome augmente l'adhésion et l'étalement des cellules sur des protéines de la matrice extracellulaire.**

Pour commencer à investiguer l'impact de l'extinction de SYK dans les cellules de mélanome, j'ai éteint SYK par interférence à ARN dans les lignées de mélanomes MeWo et Mel501 (lignées d'origine humaine, respectivement porteuses des mutations $Tp53^{+/-}$ et $BRAF^{V600E/+}$). Pour ce faire, j'ai transfecté les cellules avec une séquence d'ARN interférant (siRNA) dirigée contre la séquence ARNm de SYK et ai utilisé en contrôle une séquence neutre dirigée contre la luciférase. Après trois jours de traitement, les cellules sont récoltées et réensemencées sur plastique recouvert de fibronectine ou de collagène. L'adhésion est ensuite enregistrée par vidéomicroscopie.

Figure 46 : SYK extinction increases cell adhesion on extracellular matrix components

J'ai pu observer que l'adhérence et l'étalement des cellules éteintes pour SYK étaient accélérés aussi bien sur la fibronectine (**Fig 46a**) que sur collagène (**Fig 46c**) : dans la condition contrôle les cellules restent plus longtemps en suspension au dessus du plastique que les cellules déplétées pour SYK. Ces dernières s'assombrissent en contraste de phase et s'étalent sur les protéines matricielles plus rapidement. Les cinétiques ont ainsi été quantifiées au cours du temps sur les deux matrices (fibronectine **Fig 46b**, collagène **Fig 46d**), les cellules étant comptabilisées comme "en suspension" lorsqu'elles demeuraient parfaitement rondes et réfringentes, et considérées comme "adhérentes" lorsqu'elles changeaient de formes en s'étalant. Une différence d'environ 20% est observées entre les cellules contrôles et celles éteintes pour SYK sur fibronectine dès 8h, cet écart étant conservé jusqu'à la fin de l'observation. Sur collagène, l'écart est de moins de 10% à 8h mais augmente à 20 et 30% respectivement à 16 et 24h.

Figure 47 : SYK extinction promotes cell spreading on fibronectin

Pour établir formellement l'impact de l'extinction de SYK sur l'étalement des cellules, j'ai réalisé des immuno-marquages de Mel501 préalablement transfectées par un siRNA contre SYK et le contrôle luciférase. Après 3 jours de transfection les cellules sont collectées et ensemencées sur lamelles de verre recouvertes de fibronectine, où elles sont laissées 24h pour adhérer et s'étaler. J'ai réalisé ensuite un immuno-marquage de SYK et des marquages du noyau et de l'actine filamenteuse (au DAPI et phalloïdine, respectivement) (**Fig 47a**). J'ai ainsi pu quantifier l'étalement des cellules, soit

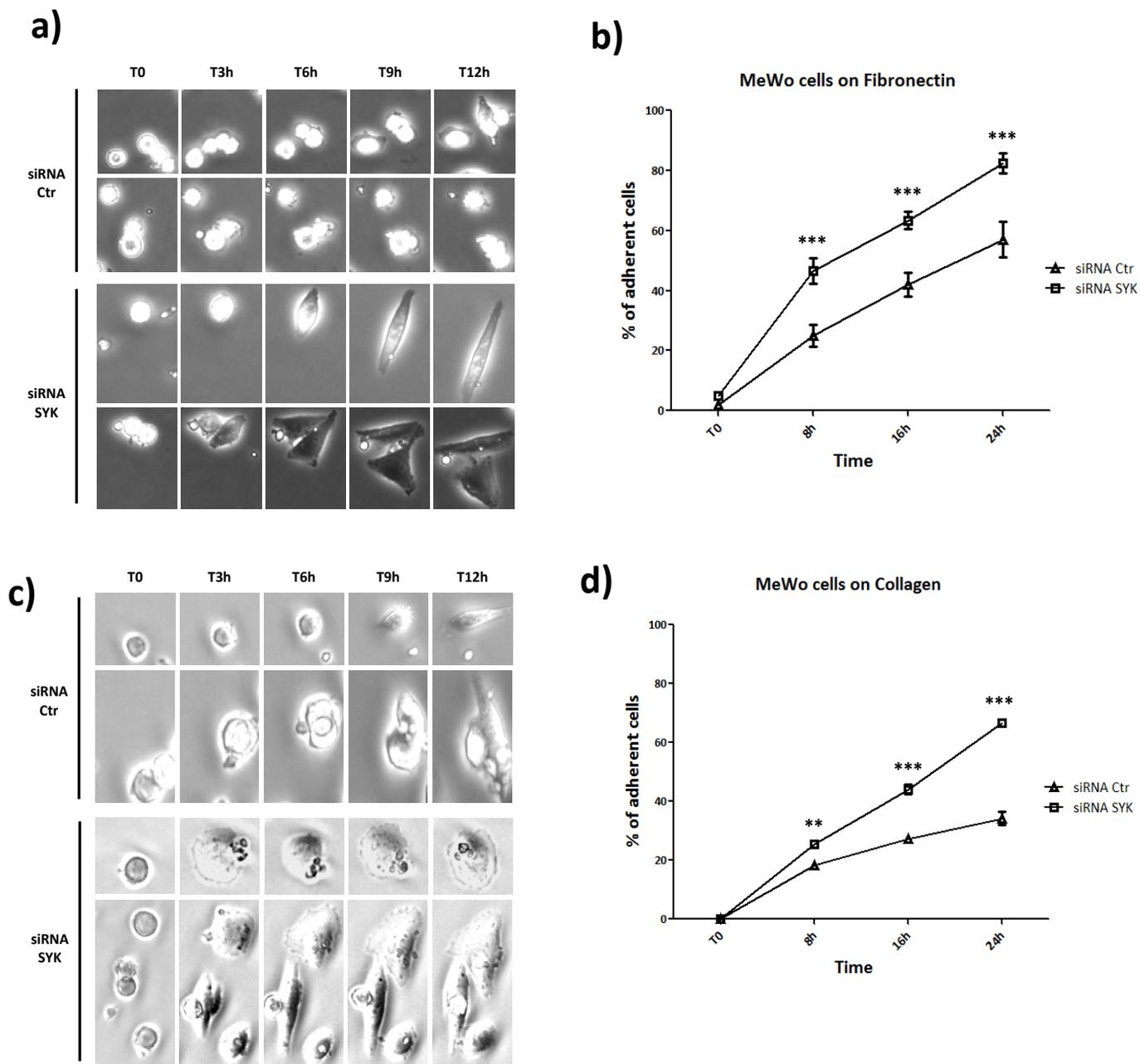
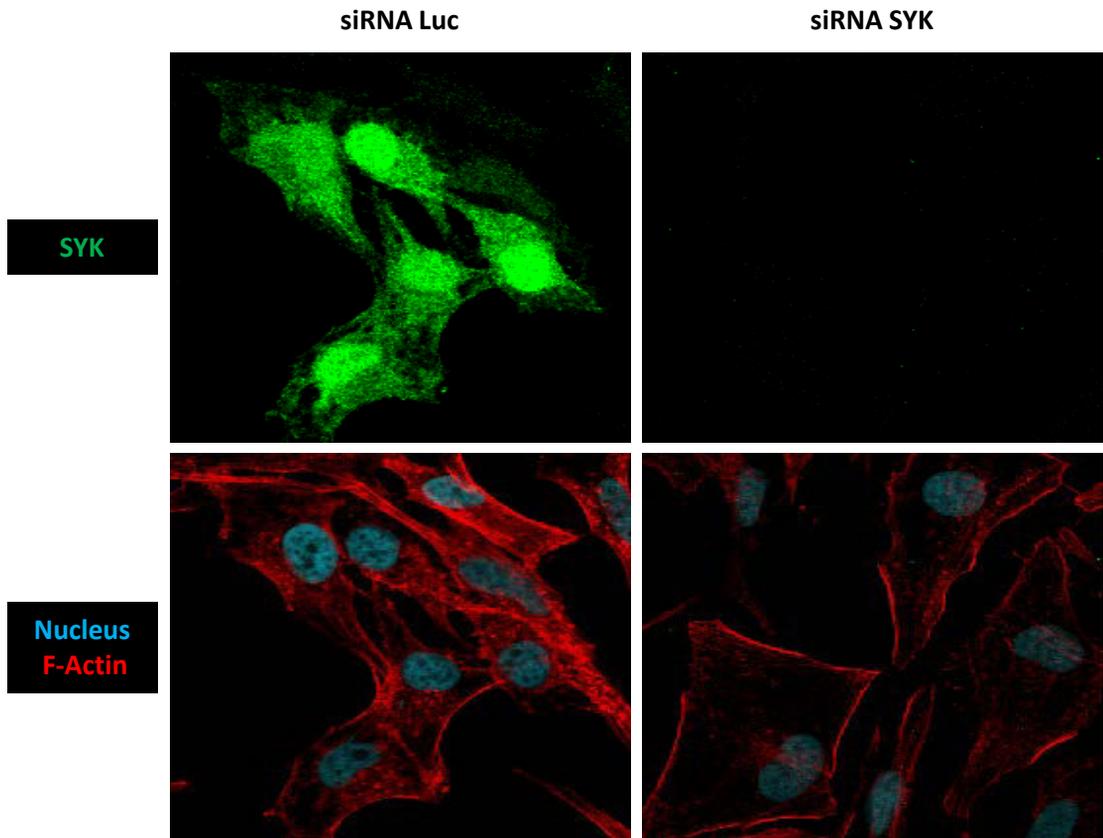


Fig 46 : SYK extinction increases cell adhesion on extracellular matrix components

MeWo cells were transfected with siRNA SYK or luciferase (Ctr) for 3 days. Cells are serum starved at day 2, then collected at day 3 with *HyQtase* and seeded on matrix coated cluster (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Cells were recorded by *time lapse* over 24h with adhesion quantified according to cell spreading on fibronectin **(a)(b)** and collagen **(c)(d)**. *p-values* were calculated by 2way ANOVA tests followed by Bonferroni post-tests (** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$).

a)

501Mel



b)

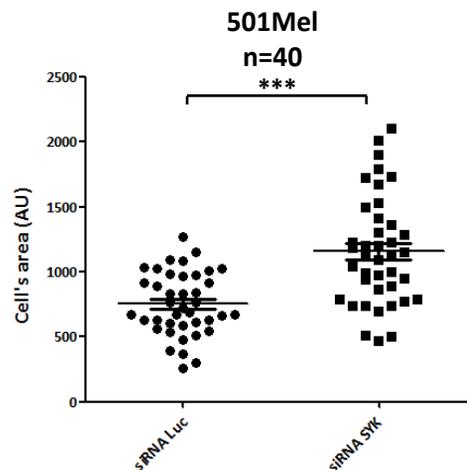


Fig 47 : SYK extinction promotes cell spreading on fibronectin

501Mel cells were transfected with siRNA SYK or luciferase (Ctr) for 3 days, then collected with *HyQtase* and seeded on fibronectin coated cover slips. **(a)** After 24h, immunofluorescence for SYK and staining for nucleus (DAPI) and F-Actin (phalloidin) were performed. Shots were taken with confocal microscopy on a Zeiss LSM510 meta. **(b)** Cells' area are measured with *ImageJ*, *p*-values were analysed with Mann Withney test ($p < 0.0001$).

exprimant SYK dans la condition contrôle, soit celles en étant déplétées. Il est donc possible de voir que les cellules dans lesquelles SYK a été éteinte ont une aire de 1,5 à 2 fois supérieure aux cellules contrôles, avec un étalement plus important (**Fig 47b**).

- **L'extinction de SYK dans le mélanome augmente la motilité cellulaire sur des protéines de la matrice extracellulaire.**

Je me suis ensuite intéressé à l'effet de l'extinction de SYK sur la motilité des cellules de mélanome. Pour ce faire, j'ai utilisé des cellules MeWo éteintes pour SYK et leur contrôle luciférase. Après deux jours, les cellules sont récupérées et ensemencées sur plastique recouvert de fibronectine ou de collagène. Elles sont laissées à l'incubateur 24h pour leur laisser le temps d'adhérer puis sont filmées par vidéomicroscopie pour à nouveau 24h. La motilité cellulaire est ensuite quantifiée avec *ImageJ* à partir des films réalisés.

Figure 48 : SYK extinction increases cell motility on extracellular matrix components

Il est ainsi possible de voir que les cellules déplétées pour SYK sont plus motiles que les cellules contrôles aussi bien sur fibronectine (**Fig 48a**) que sur collagène (**Fig 48c**). Cette augmentation de motilité est significative au regard de la distance totale accumulée des cellules individuelles (**Fig 48b et d**).

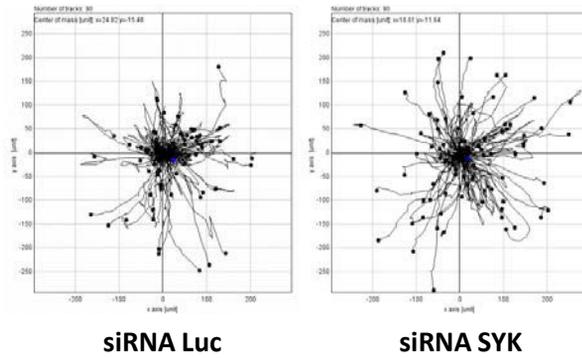
- **L'extinction de SYK dans le mélanome augmente la migration haptotactique/chimiotactique, l'invasion d'une matrice de collagène et la formation de métastases expérimentales *in vivo*.**

Etant donné que l'extinction de SYK augmente significativement l'adhésion, l'étalement et la motilité des cellules de mélanomes, l'étape suivante fut de vérifier son impact dans les processus de migration, d'invasion et de dissémination métastatique.

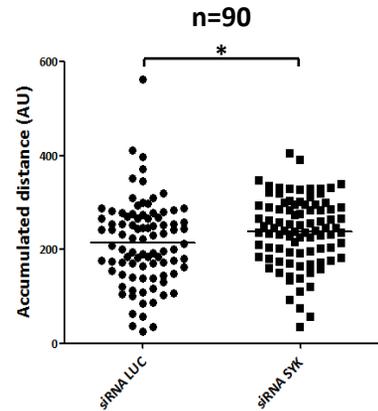
Figure 49 : SYK extinction enhances melanoma haptotactic/chimiotactic migration, collagen invasion and experimental metastasis *in vivo*

Pour tester l'effet de l'extinction de SYK sur la migration, j'ai effectué des tests en chambre de Boyden. J'ai éteint SYK dans les cellules de mélanomes MeWo, Mel501 (**Fig 49a**) et Yumm1.7 (lignée de mélanome murin primaire *Braf*^{V600E/+}; *Cdkn2a*^{-/-}; *Pten*^{-/-} (Meeth et al., 2016)) (**Fig 49b**), par

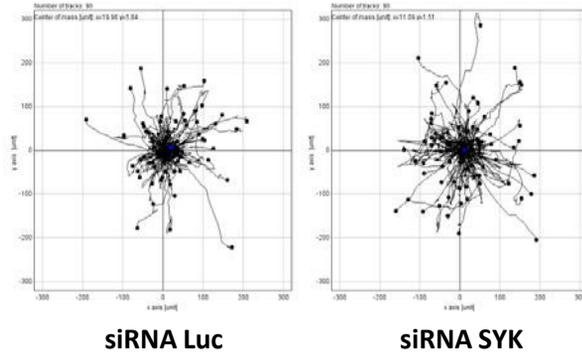
a)



b) MeWo on Fibronectin over 24h



c)



d) MeWo on Collagen over 24h

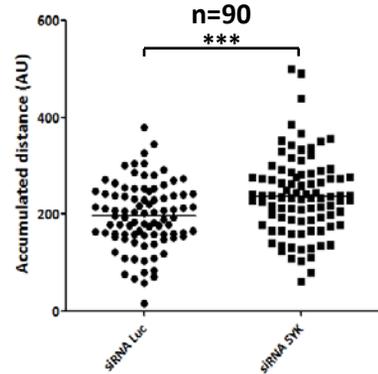


Fig 48 : SYK extinction increases cell motility on extracellular matrix components

MeWo cells were transfected with siRNA SYK or luciferase (Ctr) for 2 days, then collected with *HyQtase* and seeded on matrix coated cluster. After 24h, cells were recorded by *time lapse* over 24 more hours. Cells motility were tracked by *ImageJ* and their accumulated distance quantified on fibronectin **(a)(b)** and collagen **(c)(d)**. *p-values* were analysed with Mann Withney tests ($p < 0.0001$).

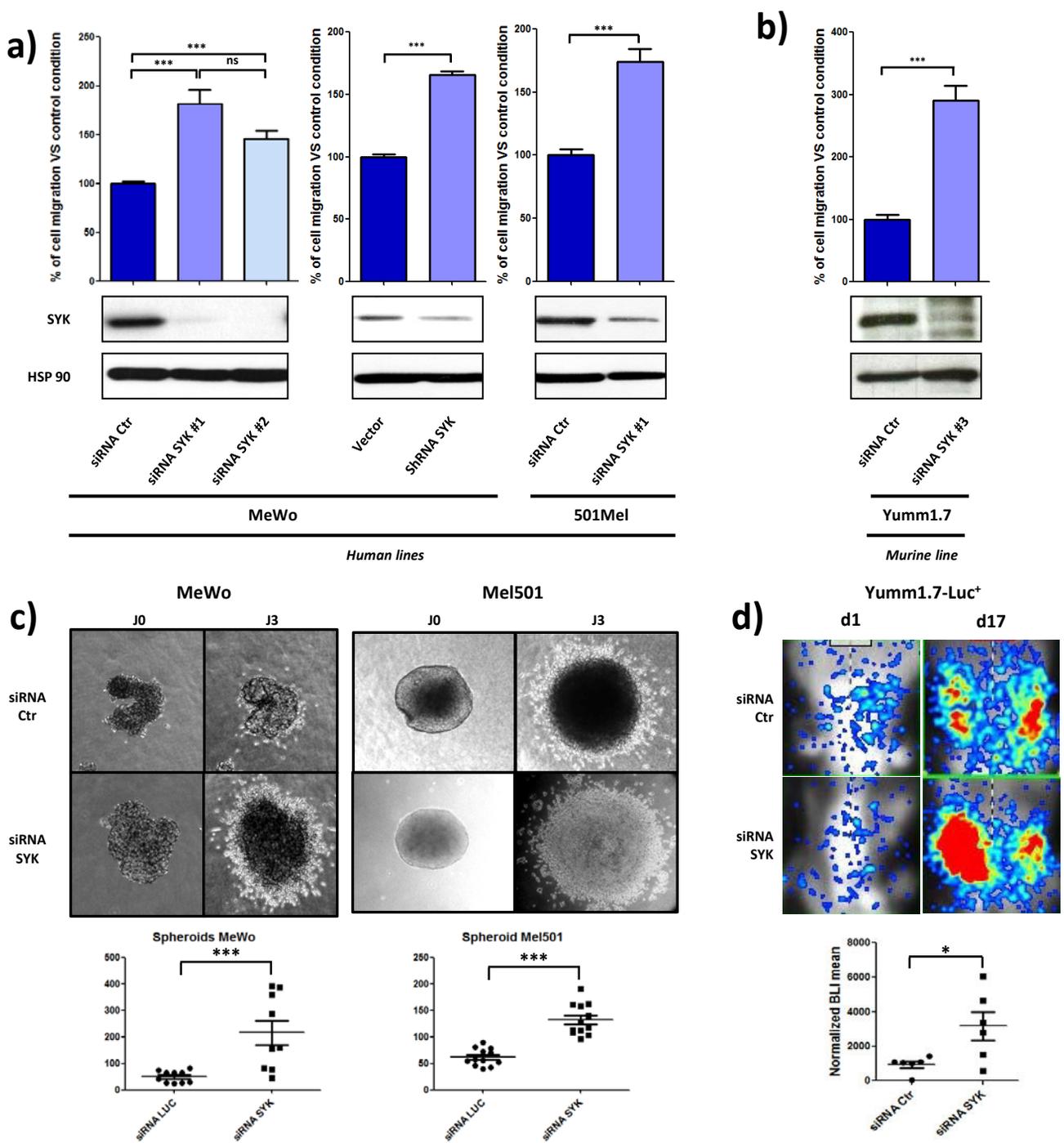


Fig 49 : SYK extinction enhances melanoma haptotactic/chimiotactic migration, collagen invasion and experimental metastasis *in vivo*

MeWo, 501Mel (**a**) and Yumm1.7 (**b**) cells were transfected with siRNA SYK or luciferase (Ctr) for 3 days. MeWo cells (**a**) were also infected with shRNA particles for SYK or the empty vector the selected for 3 weeks. Cells were serum starved at day 2, then collected at day 3 with *HyQtase* and seeded on Boyden Chamber with the bottom filter coated with fibronectin (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) and the bottom chamber filled with 10% serum media. Cell migrations are stop after 6 (Yumm1.7) or 24h (MeWo, 501Mel) and quantified with *ImageJ*. *p*-values were analysed with Mann Withney tests ($p < 0.0001$). (**c**) MeWo and 501Mel were transfected with siRNA SYK or luciferase (Ctr) for 1 day, then collected with *HyQtase* and seeded on agarose coated cluster to allow spheroids formation. After 3 days, spheroids were included in collagen matrix. Cell invasion was quantified with *ImageJ*. *p*-values were analysed with Mann Withney tests ($p < 0.0001$). (**d**) Yumm1.7-Luc⁺ cells were transfected with siRNA SYK or luciferase (Ctr) for 3 days. Cells were serum starved at day 2, then collected at day 3 with *HyQtase* and injected in the caudal vein of C57BL/6 mice. The experimental metastasis to lung were tracked with a *photon imager* after IP injection of luciferin. *p*-values were analysed with Mann Withney tests ($p < 0.05$).

interférence à ARN (par transfection siRNA et infection lentivirale shRNA). Les cellules sont déprivées en sérum la veille de la migration, puisensemencées le jour même dans des chambres de Boyden. La face inférieure des filtres est préalablement recouverte de fibronectine, et la chambre inférieure remplie de milieu contenant 10% de sérum, induisant ainsi une migration haptotactique et chimiotactique. Il est ainsi possible d'observer, quelque soit la lignée cellulaire considérée ou la méthode d'extinction, que la perte d'expression de SYK entraîne une augmentation de la migration des cellules vers les gradients haptotactiques et chimiotactiques.

Pour modéliser l'invasion *in vitro* des cellules de mélanomes, j'ai réalisé des sphéroïdes de cellules et les ai inclus dans une matrice de collagène tridimensionnelle (**Fig 49c**). La propagation des cellules à travers la matrice au cours des jours suivants est représentative des capacités d'invasion. Des cellules MeWo et Mel501 sont éteintes pour SYK par interférence à ARN, puis après un jour sont récoltées et réensemencés sur agar pour forcer l'agrégation (10.000 cellules/sphéroïdes). Après 3 jours de formation, les sphéroïdes sont inclus dans la matrice de collagène. J'ai pu observer après 3 jours d'invasion une propagation cellulaire plus massive et étendue dans la condition déplétée pour SYK par rapport à la condition contrôle.

Enfin, j'ai réalisé un test de métastases expérimentales au poumon dans des souris C57Bl/6 (**Fig 49d**). En injectant des cellules de mélanome dans la veine caudale des animaux, la quasi-totalité des cellules injectées se retrouve prisonnière du parenchyme pulmonaire dans lequel elles peuvent extravaser, mimant le processus de formation de métastases au poumon. J'ai utilisé des cellules Yumm1.7 préalablement modifiées pour exprimer la luciférase, que j'ai ensuite déplétée pour SYK par interférence à ARN. Les cellules sont déprivées en sérum au jour 2 de transfection puis récoltées au jour 3 et injectées dans la veine caudale des souris (1 million de cellules par souris). Le devenir des cellules est suivi par bioluminescence après injection intra-péritonéale de luciférine avec un *photon imager*. J'ai ainsi pu observer, après une quinzaine de jours de latence, que les animaux ayant reçu les cellules déplétées pour SYK émettaient près de 3 fois plus de bioluminescence que les conditions contrôles, ce qui est représentatif d'un nombre plus élevé de métastases pulmonaires. Une extinction par interférence à ARN n'a d'effet qu'approximativement une semaine, donc la durée de la reprise tumorale implique que l'extinction de SYK s'est estompée au jour d'arrêt de l'expérience. Les effets observés sont donc le reflet des étapes précoces du processus de métastases : extravasation et établissement de la niche tumorale.

Ces expériences permettent donc d'établir que la perte de SYK dans le mélanome favorise la migration cellulaire et l'invasion de la matrice *in vitro*, et qu'elle peut potentialiser la dissémination métastatique dans un modèle de métastase expérimentale chez la souris.

- **La réexpression de SYK dans le mélanome diminue la migration chimiotactique, l'invasion d'une matrice de collagène et la formation de métastases expérimentales *in vivo* indépendamment de son activité tyrosine kinase.**

Pour confirmer que les effets observés précédemment sur la migration, l'invasion et la formation de métastases étaient bien reliés à la perte d'expression de SYK, j'ai réalisé les mêmes expériences en suivant l'approche inverse. J'ai ainsi fait ré-exprimer SYK dans des cellules 1205lu (une lignée de mélanome mutée BRAF^{V600E} ayant perdu l'expression de SYK) par infection adénovirale, soit la forme sauvage (*Wild type*), soit une forme déficiente pour son activité kinase (*Kinase Dead*).

Figure 50 : SYK ectopic expression inhibits melanoma chemotactic migration, collagen invasion and experimental metastasis *in vivo*

Ainsi, la migration chimiotactique en chambre de Boyden (**Fig 50a**) en réponse au sérum est réduite lorsque SYK est ré-exprimée, quelque soit sa forme. De même pour ce qui est de l'invasion en matrice de collagène (résultats non montrés) et pour la formation de métastases expérimentales au poumon dans des souris *nude* (**Fig 50b**).

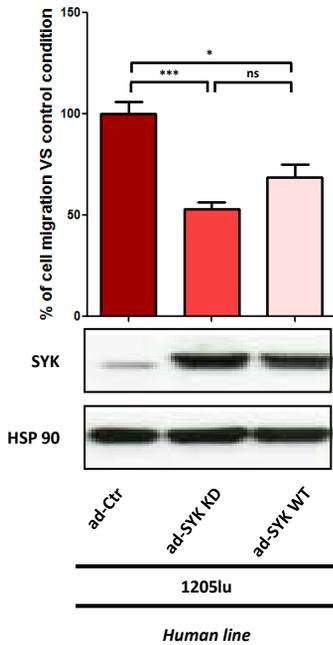
Ces expériences nous confirment que c'est l'expression même de SYK qui permet de moduler ces différents mécanismes cellulaires. De plus, comme les effets de la forme *Kinase Dead* de SYK sont identiques à ceux de la forme sauvage, cela suggère que ce rôle de SYK est indépendant de son activité de tyrosine kinase.

- **L'extinction de SYK induit une augmentation de l'intégrine $\beta 1$ et de la voie de signalisation de l'adhésion focale, ainsi qu'elle favorise un profil d'expression mésenchymateux**

Figure 51 : SYK depletion increases $\beta 1$ integrin expression, focal adhesion signaling and mesenchymal-like phenotype

Après ces observations fonctionnelles dépendantes de la perte de SYK dans le mélanome, j'ai cherché à identifier les mécanismes moléculaires mis en jeu. Ainsi, en passant par une approche par

a)



b)

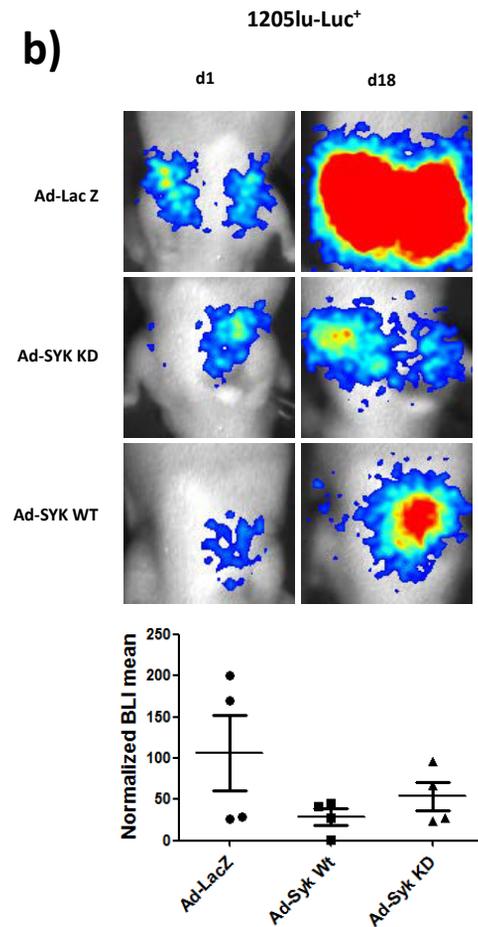


Fig 50 : SYK ectopic expression inhibits melanoma chemotactic migration, collagen invasion and experimental metastasis *in vivo*

(a) 1205Lu cells were infected with adenovirus LacZ (Ctr), SYK Wild Type ou SYK Kinase Dead for 3 days. Cells were serum starved at day 2, then collected at day 3 with *HyQtase* and seeded on Boyden Chamber with the bottom chamber filled with 10% serum media. Cell migrations are stop after 4h and quantified with *ImageJ*. *p-values* were analysed with Kruskal-Wallis test ($p < 0.0001$).

(b) 1205Lu-Luc⁺ cells were infected with adenovirus LacZ (Ctr), SYK Wild Type ou SYK Kinase Dead for 3 days. Cells were serum starved at day 2, then collected at day 3 with *HyQtase* and injected in the caudal vein of C57BL/6 mice. The experimental metastasis to lung were tracked with a *photon imager* after IP injection of luciferin.

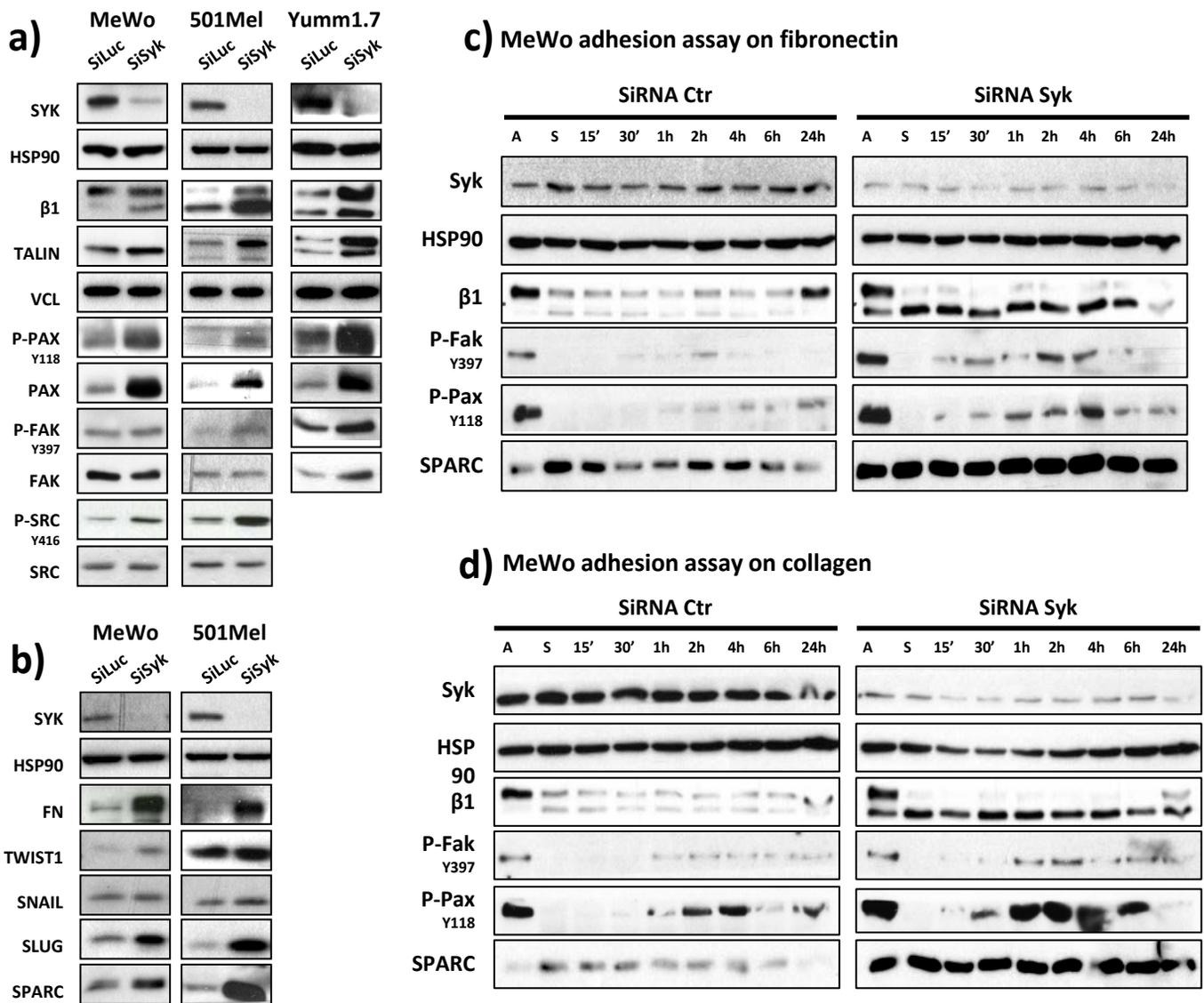


Fig 51 : SYK depletion increases β 1 integrin expression, focal adhesion signaling and mesenchymal-like phenotype

Western blot analysis of MeWo, 501Mel and Yumm1.7 after 3 days of transfection with siRNA SYK or luciferase (control). Lysats were analysed for the focal adhesion pathway (**a**) or EMT markers (**b**); Adhesion assay were performed on MeWo cell, which were transfected with siRNA SYK or Luciferase (control) for 3 days. Cells are serum starved at day 2, then collected at day 3 with HyQtase and seeded on fibronectin (**c**) or collagen (**d**) coated cluster (10 μ g/ml). Cells were lysed while adherent on the original cluster (A), in suspension (S) or after each indicated time and analysed by Western blot.

Western Blot, j'ai pu identifier que lorsque SYK est éteint par interférence à ARN, l'expression de l'intégrine $\beta 1$ est augmentée aussi bien dans les lignées humaines de mélanome MeWo et Mel501 que dans la lignée murine Yumm1.7 (**Fig 51a**). Cette augmentation d'expression de l'intégrine $\beta 1$ a des conséquences sur la signalisation de l'adhésion focale, comme l'augmentation d'expression de la taline, et de l'augmentation d'expression/phosphorylation de la paxilline, de FAK et de SRC. L'induction de cette voie par la perte de SYK est cohérente avec les phénotypes observés précédemment, pouvant ainsi expliquer l'augmentation de la motilité, de la migration, de l'invasion et de la formation de métastases. Dans le cadre d'une expérience d'adhésion sur fibronectine (**Fig 51c**) et collagène (**Fig 51d**) à partir de MeWo éteintes pour SYK par interférence à ARN, j'ai pu vérifier une cinétique d'activation de la voie de l'adhésion focale plus rapide et plus forte.

De même, j'ai observé l'augmentation de l'expression de nombreuses protéines liées à la transition de phénotype semblable à l'EMT dans les mélanomes humains MeWo et Mel501 en réponse à l'extinction de SYK (**Fig 51b**) : production de protéines matricielles telles que la fibronectine et SPARC; des facteurs de transcriptions TWIST1, SNAIL et SLUG.

- **La déplétion de SYK augmente le nombre et la stabilité des adhésions focales dans les cellules de mélanome**

Figure 52 : SYK extinction increases the number and stability of focal adhesions

Après avoir constaté le renforcement de la signalisation de l'adhésion focale, j'ai réalisé des marquages par immunofluorescence pour confirmer les conséquences phénotypiques des observations protéiques. Des cellules de MeWo sont invalidées par interférence à ARN pour SYK ou un contrôle (luciférase). Après deux jours, les cellules sont collectées et ensemencées sur des lamelles de verre recouvertes de fibronectine. Après 24h, les cellules sont fixées et immunomarquées pour les phospho-tyrosines, marqueurs des adhésions focales, et colorées au DAPI et à la phalloïdine pour révéler noyau et fibres de stress (**Fig 52a**). Les cellules de la condition déplétée pour SYK présentent près du double d'adhésions focales que les cellules contrôles (**Fig 52b**). De plus, ces adhésions focales sont plus lumineuses et étendues: j'ai quantifié par *ImageJ* la fluorescence émise par chaque adhésion focale, cette donnée étant représentative de la taille de chaque adhésion focale. L'observation de la distribution de cette donnée de fluorescence montre que la taille est significativement plus importante dans les cellules déplétées pour SYK que dans les cellules contrôles, passant d'une médiane de fluorescence de 83 à 93 (**Fig 52c**). Ces adhésions focales

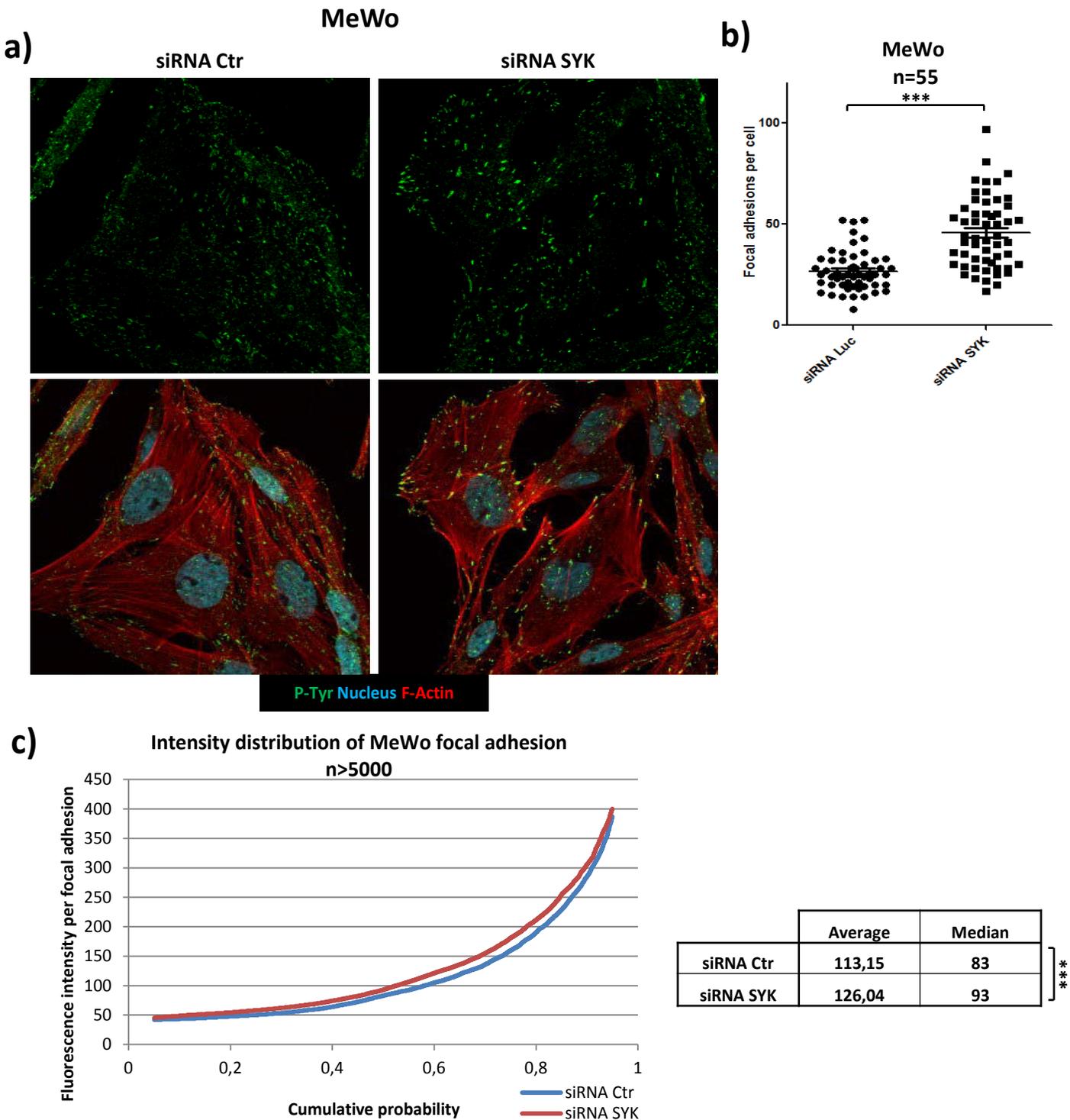


Fig 52 : SYK extinction increases the number and stability of focal adhesions

(a) MeWo cells were transfected with siRNA SYK or luciferase (Ctr) for 3 days, then collected with *HyQtase* and seeded on fibronectin coated cover slips. After 24h, immunofluorescence for phospho-tyrosine (P-Tyr) and staining for nucleus (DAPI) and F-Actin (phalloidin) were performed. Images were taken with confocal microscopy on a Zeiss LSM510 meta. **(b)** The number of focal adhesions per cell was quantified manually, *p-values* were analysed with Student t tests ($p < 0.0001$). **(c)** The size of focal adhesions was analysed with *ImageJ* by measuring fluorescence intensities of P-Tyr staining. The first and last 5% of measures were discarded to reduce the noise. Average and median *p-values* were analysed with Student t tests ($p < 0.0001$)

plus nombreuses et plus importantes sont représentatives d'une meilleure adhésion au substrat et d'une plus grande stabilité.

- **SYK et l'intégrine $\beta 1$ se localisent dans les mêmes structures mais pas directement dans les adhésions focales**

Figure 53 : Co-localization of SYK and $\beta 1$ integrin

Etant donné l'impact de l'extinction de SYK sur la modulation de la signalisation de l'intégrine $\beta 1$ et les adhésions focales, j'ai cherché à savoir si SYK et l'intégrine $\beta 1$ interagissait directement dans le mélanome.

Pour ce faire, j'ai réalisé un fractionnement afin de séparer le contenu protéique des différents compartiments cellulaires à partir de cellules MeWo préalablement éteintes pour SYK (**Fig 53a**). La régulation des intégrines passe par le mécanisme du recyclage par internalisation, j'ai donc également réalisé un fractionnement sur ces mêmes cellules après les avoir mises en suspension afin d'induire ce recyclage des intégrines membranaires. Dans les cellules exprimant SYK, la kinase se situe au niveau du cytosol et du noyau, la mise en suspension des cellules entraînant sa relocalisation dans le compartiment microsomal. Pour ce qui est de l'intégrine $\beta 1$, son cycle de maturation, de glycosylation et de recyclage la distribue entre fractions cytosoliques, microsomales et membranaires dans les cellules adhérentes. Lors du passage en suspension, la quantité de l'intégrine diminue, semblant se concentrer dans la fraction microsomale, probablement suite à son internalisation. La relocalisation de SYK dans la fraction microsomale lors de la mise en suspension pourrait s'expliquer par le fait que la kinase serait entraînée par l'intégrine ou ses complexes associés lors du recyclage forcé. Dans les cellules éteintes pour SYK, l'expression de l'intégrine $\beta 1$ est renforcée dans la fraction microsomale pour les cellules adhérentes. Mais lors de la mise en suspension, la forme hyperglycosylée de $\beta 1$ (la forme mature) semble être stabilisée à la membrane, tandis que seule la forme hypoglycosylée (la forme immature) est conservée dans la fraction microsomale. La perte de SYK semble donc favoriser la stabilisation de la forme active de l'intégrine $\beta 1$ à la membrane cellulaire, affectant son recyclage.

J'ai ensuite voulu vérifier les localisations membranaires relatives de SYK et l'intégrine $\beta 1$, ainsi que leurs situations par rapport aux adhésions focales. Pour ce faire, j'ai surexprimé par transfection de plasmide des formes fluorescentes de SYK, de l'intégrine $\beta 1$ et de la paxilline dans des HEK293 et les ai analysées par TIRF (total internal reflection fluorescence microscopy) (**Fig 53b**). Cette technique de microscopie utilise la réflexion totale interne, qui survient lorsque la lamelle de verre est frappée

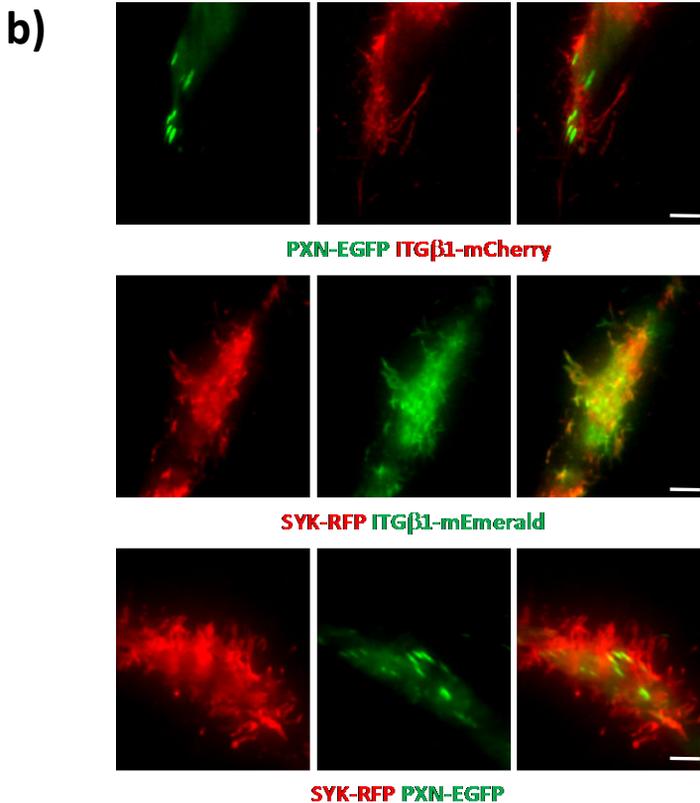
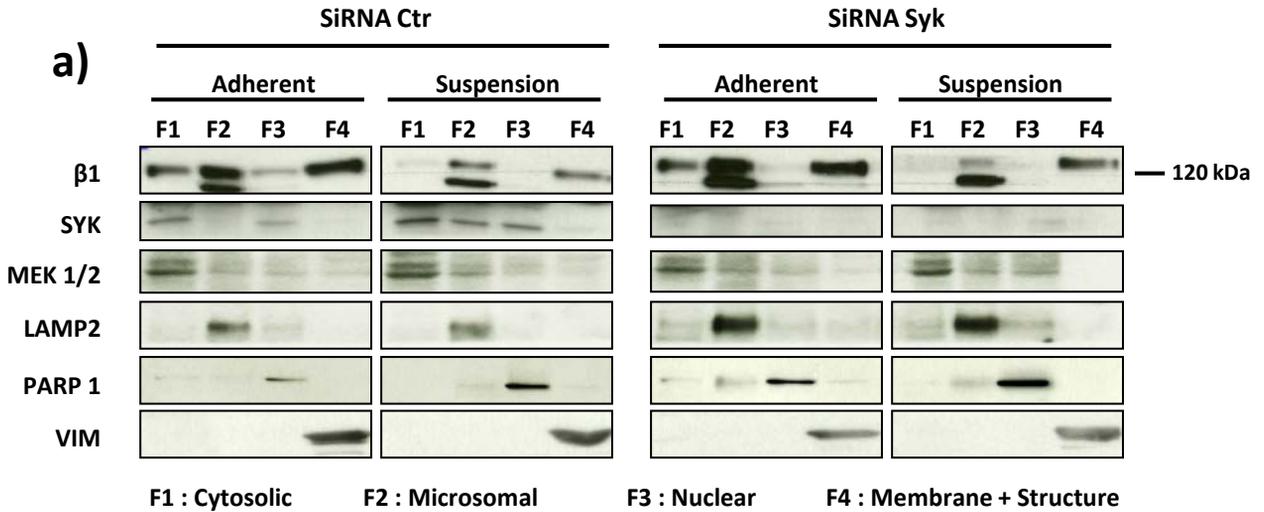


Fig 53 : Co-localization of SYK and $\beta 1$ integrin

(a) Mewo cells were transfected with siRNA SYK or control. After 3 days, cells were fractionated with Thermo Scientific™ Kit 10455924 while adherents on plastic cluster or after collection with *HyQtase* and kept 30' in suspension before lysis. Immunoblotting of MEK1/2, LAMP2, PARP1 and Vimentin attest the purity of the fractionation; **(b)** TIRF analysis of SYK, $\beta 1$ integrin and Paxillin distribution in HEK293 cells. Cells were transfected with plasmids expressing SYK-RFP, ITG $\beta 1$ -mCherry, ITG $\beta 1$ -mEmerald or PAXN-EGFP proteins. At day 2 cells were collected and seeded on fibronectin coated glass cover slips. After 24h, living cells were analysed by TIRF (total internal reflection fluorescence) microscopy on a Leica AM-TIRF. Scale bar = 5 μ m.

selon un angle d'incidence précis qui génère une onde évanescente sur une épaisseur maximale de 200 nm au delà du verre. Cette technique permet une résolution de grande qualité pour les structures membranaires fixées au verre. La paxilline se localise au niveau des adhésions focales. De manière intéressante, ni SYK ni l'intégrine $\beta 1$ ne semblent se localiser au niveau des adhésions focales. Par contre, les deux se localisent dans des structures filamenteuses plaquées à la membrane, bordant mais parfaitement exclues des zones marquées par la paxilline. SYK et l'intégrine $\beta 1$ semblent donc pouvoir être liées directement ou indirectement dans les mêmes structures membranaires, indépendamment des adhésions focales même.

- **L'excision du gène *Syk* dans le lignage mélanocytaire chez la souris n'affecte pas l'homéostasie cutanée ni la réponse aux UV.**

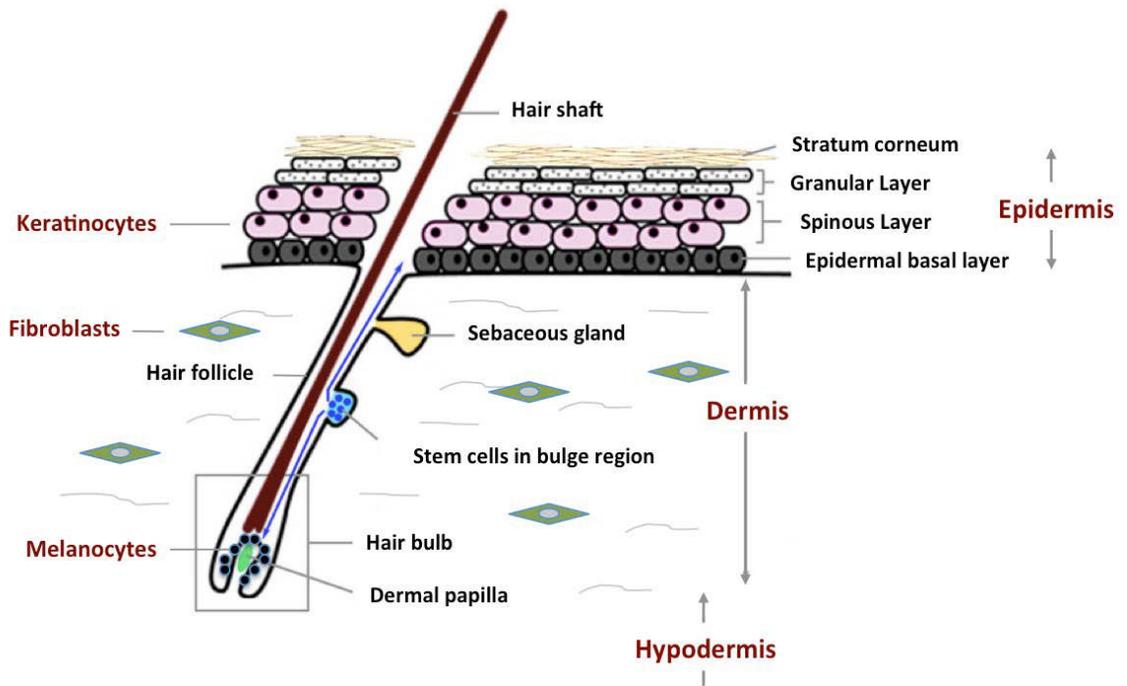
Figure 54 : Relevance of the mouse model in studying *Syk* function in melanocyte development and melanomagenesis

Afin de documenter plus avant l'impact de SYK dans l'initiation tumorale du mélanome, nous avons développé un modèle murin transgénique permettant d'invalider spécifiquement l'expression de *Syk* dans le lignage mélanocytaire. Ce modèle est relevant par rapport à la pathologie humaine du mélanome (**Fig 54a**), les mélanocytes cutanés murins et humains se localisant dans les bulbes pileux afin d'assurer leur pigmentation. Une différence demeure, la peau humaine possède également des mélanocytes hors des bulbes pileux, à la jonction derme/épiderme afin d'assurer la pigmentation de la peau. Cette population de mélanocytes est absente de la peau des souris mais présente dans la peau de la queue. Ainsi, sur l'animal dans sa globalité nous pouvons retrouver une distribution des mélanocytes proche de l'Homme. L'expression du gène *Syk* dans les mélanocytes murins est un argument de plus validant ce modèle d'étude (**Fig 54b**).

Figure 55 : Construction of a *Syk* conditional knockout allele

Afin de cibler spécifiquement ce lignage, la séquence codante pour la recombinaise Cre a été placée sous le contrôle du promoteur de la tyrosinase, une protéine spécifique du lignage mélanocytaire. Les animaux porteurs du transgène *Tyr::Cre* sont donc capables de provoquer l'excision des transgènes porteurs de séquences *loxP* spécifiquement dans ce lignage (Delmas et al., 2003). L'équipe a fait générer des animaux *Syk^{fllox}* par l'Institut Clinique de la Souris, insérant des séquences *loxP* de part et d'autre des exons 2 et 3 de *Syk* permettant l'invalidation du gène suite à leur excision (**Fig 55a et b**). J'ai pu vérifier l'efficacité du transgène en extrayant des fibroblastes

a)



b)

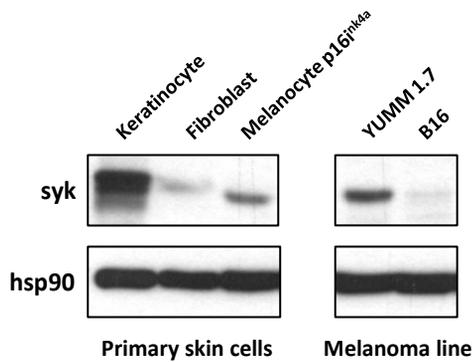


Fig 54 : Relevance of the mouse model in studying Syk function in melanocyte development and melanomagenesis

(a) Cartoon depicting the structure of the mouse skin and hair follicle; **(b)** Syk expression in mouse skin cells and mouse melanoma cell lines.

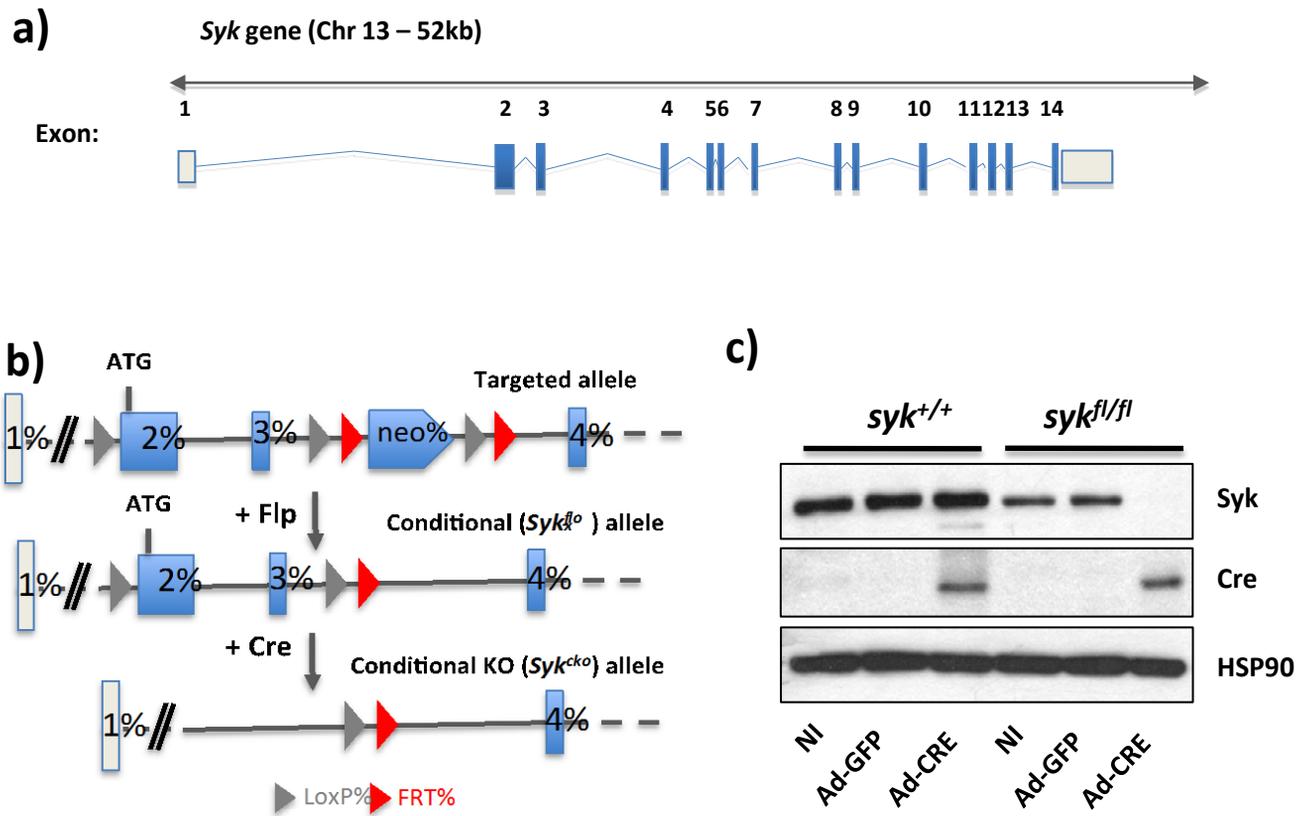


Fig 55 : Construction of a *Syk* conditional knockout allele

(a) Schematic organization of the *Syk* gene. **(b)** Targeting strategy of the *Syk* locus. Diagram illustrating recombination of loxP sites flanking *Syk* targeted locus (Exons 2 & 3) via Cre recombinase and recombination of FRT sites flanking the neo cassette via the Flp recombinase. **(c)** Effective Cre/loxP-mediated *Syk* ablation in cultured MEFs: Mouse Embryonic Fibroblasts (MEFs) from embryonic day 13.5 mouse embryos of the *Syk* wild-type and *Syk*^{fl/fl} genotypes were infected or not (NI) with an adenovirus-GFP control (Ad-GFP) or an adenovirus expressing the Cre recombinase (Ad-Cre). After 3 days, cell lysates were prepared and the expression of *Syk*, Cre recombinase and Hsp90 analysed by Western blot.

embryonnaires murins et en les infectant avec un adénovirus exprimant la recombinaise Cre, invalidant l'expression de SYK (**Fig 55c**). Après croisement de ces animaux avec les animaux porteurs du transgène *Tyr::Cre*, j'ai ainsi obtenu le modèle d'invalidation conditionnelle de *Syk* dans le lignage mélanocytaire *Tyr::Cre;Syk^{flxflx}*. L'expression de la tyrosinase s'enclenche à 11,5 jours dans le développement embryonnaire, la perte de *Syk* dans le lignage mélanocytaire à ce stade n'a donc pas de conséquences délétères pour le développement embryonnaire.

Figure 56 : *Tyr::Cre;Syk^{flxflx}* mouse model of *Syk* invalidation in the melanocytic lineage

Les souris *Tyr::Cre;Syk^{flxflx}* possèdent des mélanocytes n'exprimant plus SYK comme l'indique une analyse en immuno-histochimie sur coupe de peau (**Fig 56c**) et ne présentent pas d'altérations phénotypiques majeures ni au niveau macroscopique (pilosité, pigmentation...)(**Fig 56a**) ni en ce qui concerne l'homéostasie cutanée (**Fig 55b**). Ces animaux ont été laissés à vieillir et n'ont pas présenté naturellement de phénotypes particuliers ni de baisse significative de leur durée de vie (données non montrées). Cependant, dans l'hypothèse d'une implication de SYK dans l'initiation du mélanome, qui est majoritairement induite par l'exposition UV, il a été intéressant de tester si son excision impactait la réponse au stress UV des animaux transgéniques. En effet, il a été montré qu'un stress UV pouvait suffire à déclencher la transformation des mélanocytes en mélanome dans un font mutationnel permissif mais non suffisant à la transformation tumorale : par exemple, l'expression de l'oncogène *BRAF^{V600E}* ne suffit pas à induire la transformation tumorale des mélanocytes en mélanome, mais une irradiation UV des animaux porteurs de la mutation déclenche la pathologie (Viros et al., 2014). Je me suis basé sur le protocole d'exposition UV de l'équipe Merlino (Jhappan et al., 2003; Zaidi et al., 2012), exposant des animaux nouveaux nés de 3 jours sauvages, *Tyr::Cre;Syk^{flxflx}* et les génotypes intermédiaires, à une dose UV de 20 SED (Standard Erythemat Dose, 1 SED étant la dose d'UV suffisante pour induire un coup de soleil léger chez l'homme) avec un irradiateur (**Fig 56d**). Le rayonnement UV utilisé a été soit d'une composition proche de la lumière solaire (95% UVA et 5% UVB), soit purement composé d'UVB, le rayonnement UV responsable des dommages cutanés. Selon ce protocole, aucun phénotype particulier n'est survenu aux cours des expérimentations, ni naevi dans les contrôles sauvages, ni altération de la réponse dans les transgéniques (**Fig 56e**). Cette approche n'a ainsi pas été concluante dans l'étude de l'impact de SYK dans la réponse UV, le modèle doit être amélioré, par exemple en couplant le KO conditionnel de *Syk* avec l'expression de l'oncogène *BRAF^{V600E}* (Viros et al., 2014).

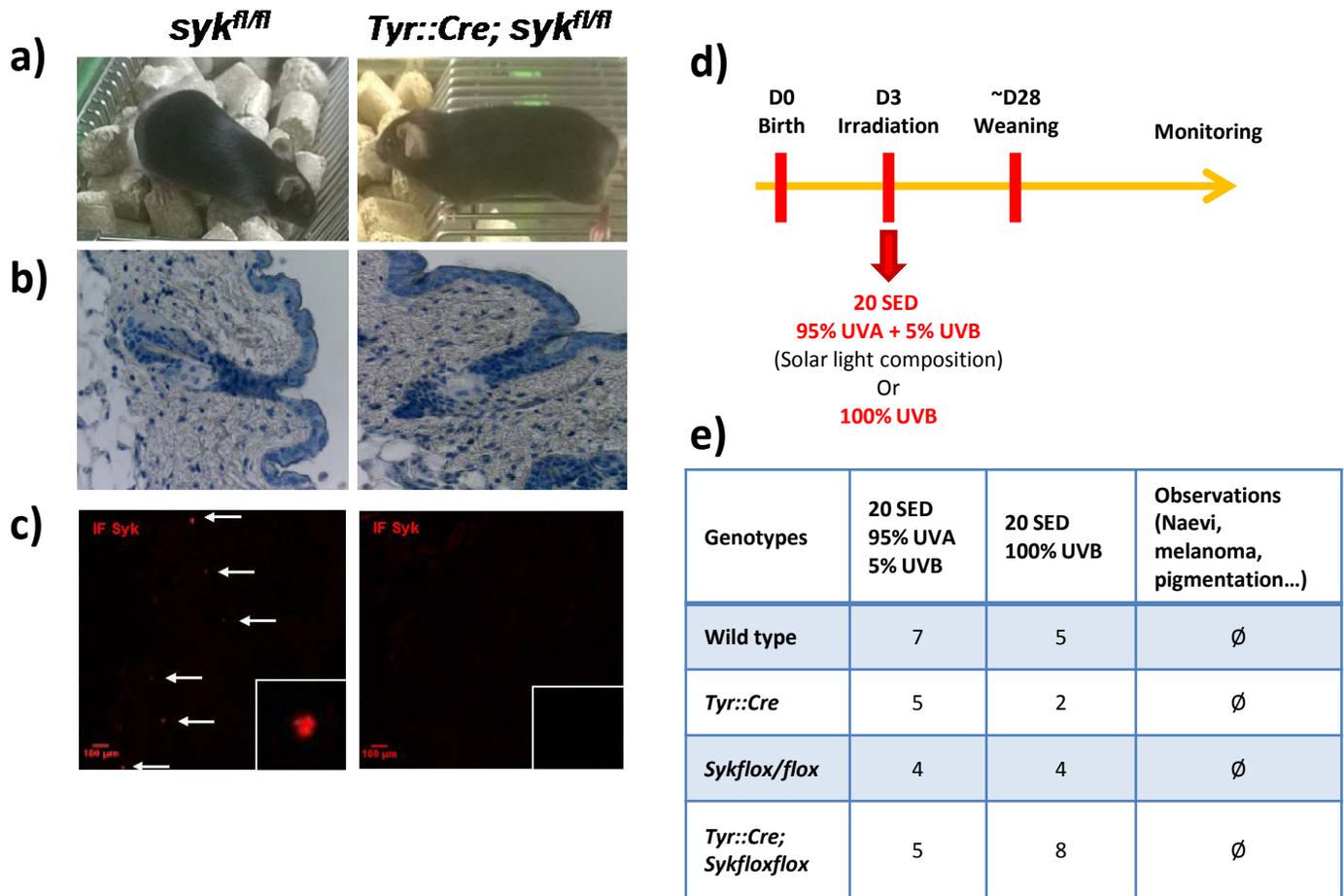


Fig 56 : *Tyr::Cre;Sykflox/flox* mouse model of *Syk* invalidation in the melanocytic lineage

(a) Macroscopic observation of a wild-type mouse (*syk^{fl/fl}*) or a mouse harbouring *Syk*-deficient melanocytes (*Tyr::Cre; syk^{fl/fl}*); **(b)** Hematoxylin staining on skin sections of *syk^{fl/fl}* and *Tyr::Cre; syk^{fl/fl}* mice; **(c)** *Syk* immunofluorescence staining on skin cryosections. White arrows indicate *Syk*⁺ melanocytes. Images were taken with confocal microscopy on a Zeiss LSM510 meta; **(d)** Cartoon depicting the UV induction protocol : newborns mice were exposed to 20 SED UV radiation (95%UVA/5%UVB or 100%UVB) at day 3 after birth, then weaned at 28 days. They were monitored afterward until the end of the experiment (12 months); **(e)** Spreadsheet summing mice numbers and observations for the two UV induction experiments.

- L'excision du gène *Syk* du lignage mélanocytaire dans un fond transgénique *Braf*^{V600E/+}; *Pten*^{-/-} semble renforcer l'invasion tumorale.

Figure 57 : Implication of *Syk* in melanoma development in mice : macroscopic observation

L'excision du gène *Syk* dans la souris ne semble pas, seule, être capable d'induire la transformation des mélanocytes en mélanome, et ce même sous stress UV. Cependant, la perte de *Syk* dans un contexte mutationnel préétabli pourrait potentialiser l'apparition et l'agressivité du mélanome. Les animaux *Syk*^{flox} ont ainsi été croisés avec d'autres animaux porteurs des transgènes *Tyr::CreERT2*, *Braf*^{ΔSLV600E} et *Pten*^{flox} (Dankort et al., 2009; Dhomen et al., 2009; Yajima et al., 2006). Le transgène *Tyr::CreERT2* permet l'expression de la recombinase CreERT2 sous le contrôle du promoteur de la tyrosinase spécifique du lignage mélanocytaire, l'activation de la recombinase étant dépendante de l'application topique d'hydroxy-tamoxifène. Le "knock-in" *Braf*^{ΔSLV600E} induit l'expression de l'oncogène BRAF^{V600E} après recombinaison du gène par la CreERT2 activée par l'hydroxy-tamoxifène, tandis que le transgène *Pten*^{flox} invalide le gène *Pten* après l'excision des sites *loxP* qu'il contient. Les animaux *Tyr::CreERT2;Braf*^{ΔSLV600E/+}; *Pten*^{flox} sont décrits dans la littérature (Dankort et al., 2009) : alors que l'induction seule de BRAF^{V600E} ne provoque que de simples naevi hyperplasiques bénins, non cancéreux, la coopération de l'oncogène avec la perte de PTEN enclenche l'apparition de mélanomes invasifs et métastatiques. En associant ces transgènes avec les animaux *Syk*^{flox}, il pourra être estimé si l'excision de *Syk* est un facteur aggravant dans l'apparition de mélanomes induits par l'expression de BRAF^{V600E} et la perte de PTEN (**Fig 57a**).

Des animaux porteurs des génotypes suivants sont traités à l'hydroxy-tamoxifène sur 2 semaines :

- *Tyr::CreERT2;Pten*^{flox/flox}; *Syk*^{flox/flox},
- *Tyr::CreERT2;Braf*^{ΔSLV600E}; *Syk*^{flox/flox},
- *Tyr::CreERT2;Braf*^{ΔSLV600E/+}; *Pten*^{flox/flox}
- *Tyr::CreERT2;Braf*^{ΔSLV600E/+}; *Pten*^{flox/flox}; *Syk*^{flox/flox}

Après 2 semaines supplémentaires, de nombreuses lésions cutanées, des naevi et des mélanomes apparaissent sur les zones d'applications topique des souris *Tyr::CreERT2;Braf*^{ΔSLV600E/+}; *Pten*^{flox/flox}; *Syk*^{flox/flox} et *Tyr::CreERT2;Braf*^{ΔSLV600E/+}; *Pten*^{flox/flox} (**Fig 57b**). Les animaux non porteurs des transgènes combinés *Braf*^{ΔSLV600E} et *Pten*^{flox/flox} ne développent aucune lésion (les photographies de la figure 12 montrent une souris *Tyr::CreERT2;Pten*^{flox/flox}; *Syk*^{flox/flox}, représentative de son groupe ainsi que du groupe *Tyr::CreERT2;Braf*^{ΔSLV600E}; *Syk*^{flox/flox}, les deux groupes étant semblables dans leur absence de réaction). Dans les groupes développant des lésions, les animaux ont probablement léchés la zone

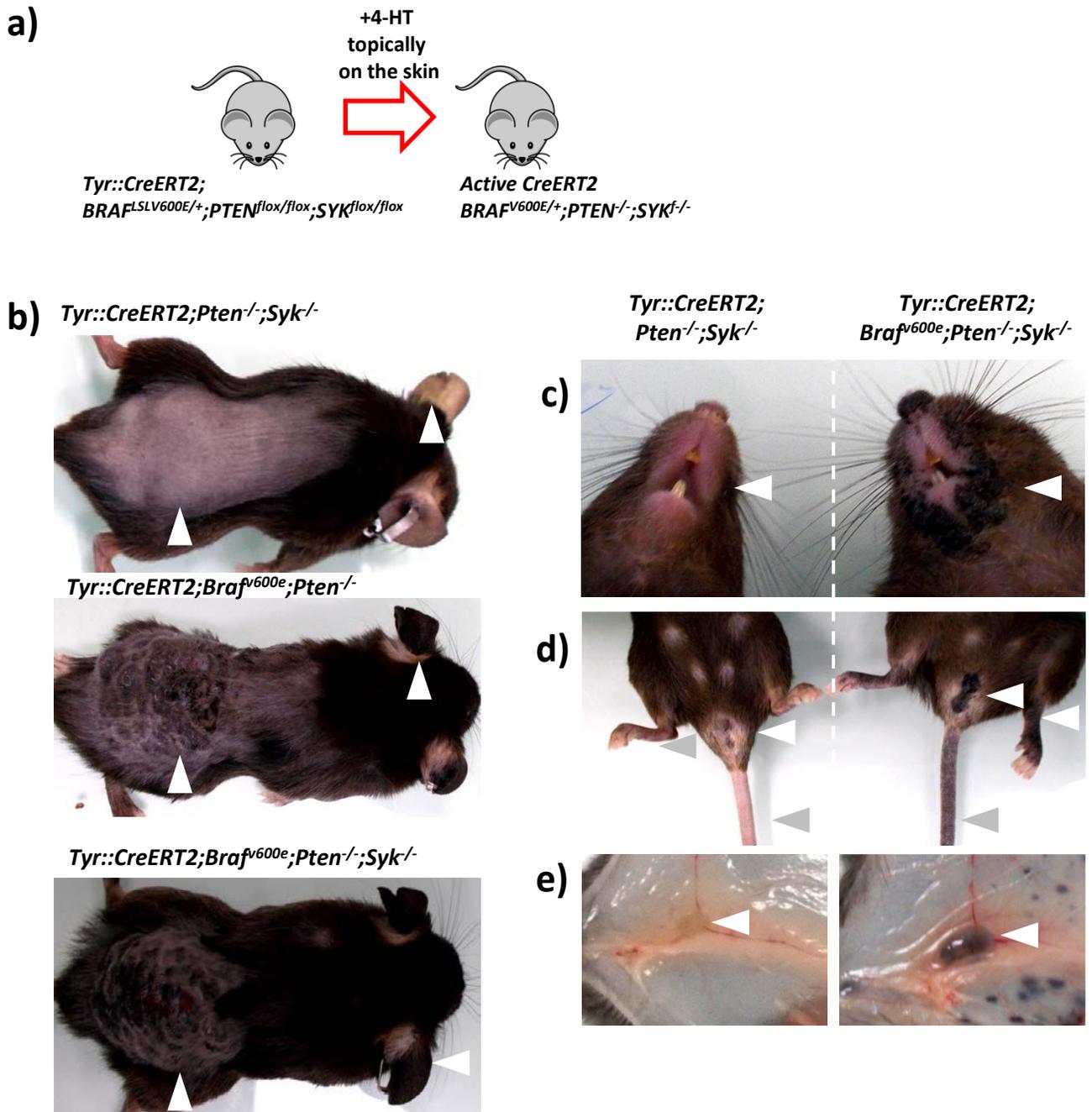


Fig 57: Implication of *Syk* in melanoma development in mice : macroscopic observation

(a) Cartoon depicting the conditional melanoma mice models used in this study. Application of 4-HT onto mouse skin activates CreERT2 in melanocytes (*Tyr::CreERT2*) inducing simultaneous expression of oncogenic *Braf* (*Braf^{V600E}*) and inactivation of *Pten* along with ou without *Syk* inactivation;

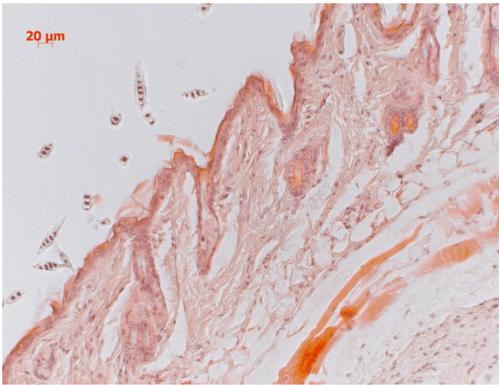
Macroscopic observation of mice where expression of oncogenic *Braf* was accompanied by inactivation of *Pten* and/or *Syk*. White arrowheads show the induction of melanomas on the mouse back, hear **(b)**, muzzle **(c)**, tail, paw, anus and genitalia hyperpigmentation **(d)** and lymph node (LN) invasion **(e)**.

d'application, faisant entrer l'hydroxy-tamoxifène dans la circulation systémique en moindre dose, provoquant l'hyper-pigmentation des oreilles (**Fig 57b**), du museau (**Fig 57c**), de la queue, des pattes et de la zone anno-génitale (**Fig 57d**). Ces animaux ont été disséqués, révélant la présence de métastases lymphatiques pigmentées aux ganglions drainant la zone d'application (**Fig 57e**). Aucune autre métastase n'a été détectée en dehors des ganglions, probablement due à l'arrêt précoce de l'expérience qui n'a pas permis leur apparition.

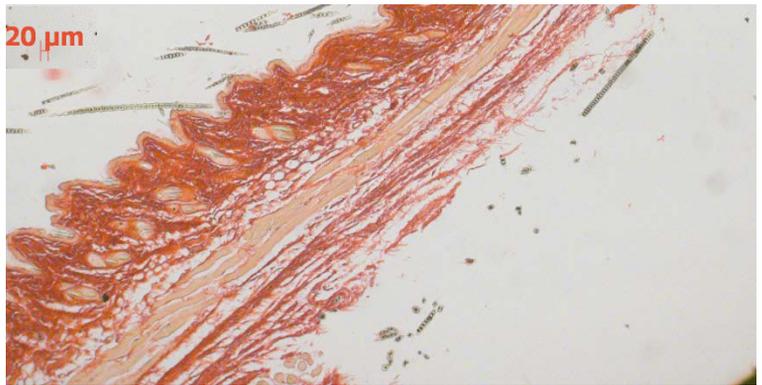
Figure 58 : Implication of *Syk* in melanoma development in mice : histological analysis

La peau des animaux des différents groupes a été prélevée et analysée par histologie en coupe de paraffine. Si les deux groupes ayant générés des tumeurs présentent bien une invasion du derme par les cellules pigmentées de mélanomes, le groupe *Tyr::CreERT2;Braf^{d.SLV600E/+};Pten^{flox/flox};Syk^{flox/flox}* semble présenter une prolifération plus importante *in situ* (**Fig 58 a,b,c**), la peau étant également plus fibrosée (révélée par un marquage au Sirius Red, colorant en rouge le collagène polymérisé) que dans le groupe *Tyr::CreERT2;Braf^{d.SLV600E/+};Pten^{flox/flox}* (**Fig 58 d,e,f**). Ces résultats préliminaires sont encourageants et semblent confirmer le rôle de *Syk* dans la transformation des mélanocytes en mélanome invasif en conjonction avec d'autres mutations. Cependant, ces observations restent basées sur un petit nombre d'animaux et devront être étayées.

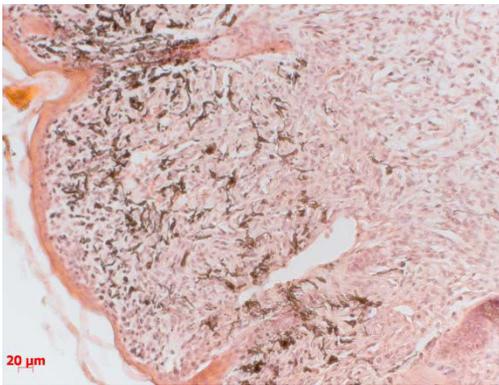
a) HE *Tyr::CreERT2;Pten^{-/-};Syk^{-/-}*



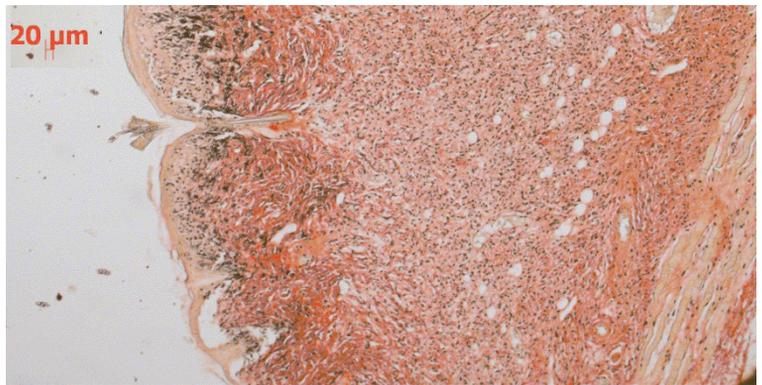
d) Sirius Red *Tyr::CreERT2;Pten^{-/-};Syk^{-/-}*



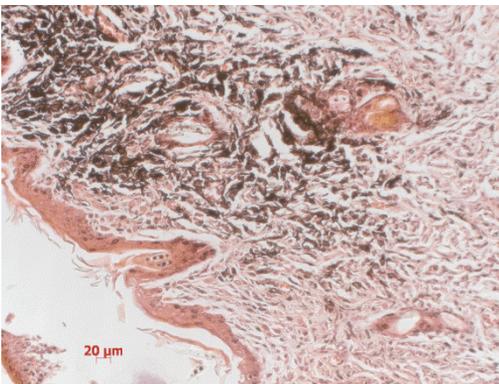
b) HE *Tyr::CreERT2;Braf^{v600e};Pten^{-/-}*



e) Sirius Red *Tyr::CreERT2;Braf^{v600e};Pten^{-/-}*



c) HE *Tyr::CreERT2;Braf^{v600e};Pten^{-/-};Syk^{-/-}*



f) Sirius Red *Tyr::CreERT2;Braf^{v600e};Pten^{-/-};Syk^{-/-}*

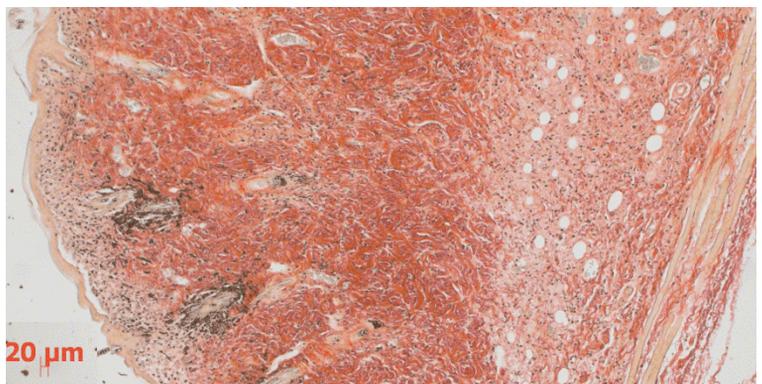


Fig 58 : Implication of *Syk* in melanoma development in mice : histological analysis

(**a,b,c**) Hematoxylin-Eosin staining of skin sections showing deeper invasion and (**d,e,f**) Sirius Red staining showing deeper fibrosis of *Braf^{v600e/+}; Pten^{-/-}; Syk^{-/-}* tumor cells into the dermis as compared to *Braf^{v600e/+}; Pten^{-/-}* tumor cells and non reactive skin (*Pten^{-/-}; Syk^{-/-}*).

VI. Discussion et perspectives

Le cancer est une pathologie complexe, pouvant dériver de nombreux types cellulaires et déclenché par de nombreuses mutations, modifications épigénétiques et microenvironnementales, multipliant à l'infini les possibilités de statuts tumoraux et faisant de chaque cancer un cas à part. Cependant, de grandes constantes sont retrouvées, les tumeurs dérivant d'une même source utilisent souvent des mécanismes similaires, les processus d'échappement au contrôle cellulaire d'un organisme reposant sur de grandes voies de mieux en mieux comprises.

L'expression de SYK dans les différentes pathologies cancéreuses a été définie comme "schizophrénique" (Krisenko and Geahlen, 2015) : SYK joue un rôle oncogénique dans de nombreux cancers, notamment dans les cancers hématopoïétiques comme les leucémies myéloïdes et lymphoblastiques (Buchner et al., 2009; Chen et al., 2008; Gobessi et al., 2009; Hahn et al., 2009; Miller et al., 2013; Oellerich et al., 2013; Perova et al., 2014; Uckun et al., 2010; Uckun et al., 2013), et les lymphomes (Feldman et al., 2008; Leseux et al., 2006; Pechloff et al., 2010; Rinaldi et al., 2006; Ruiz-Ballesteros et al., 2005), mais aussi dans divers cancers "solides", notamment les carcinomes (Bach et al., 2014; Udyavar et al., 2013), le cancer du poumon (Fotheringham et al., 2012; Prinos et al., 2011; Zhang et al., 2012), le cancer du pancréas (Fotheringham et al., 2012) et le rétinoblastome (Singh et al., 2009); à l'inverse SYK peut agir tel un suppresseur de tumeur dans les cancers du sein (Blancato et al., 2014; Coopman et al., 2000), pancréatiques (Layton et al., 2009), gastriques (Nakashima et al., 2006), hépatiques (Yuan et al., 2006) et le mélanome (Hoeller et al., 2005; Muthusamy et al., 2006; Bailet et al., 2009). Cette action duale de SYK présuppose des mécanismes différents dépendant du lignage cellulaire et du contexte mutationnel. Ainsi, selon la pathologie, l'activité tyrosine kinase de SYK, sa localisation sub-cellulaire, son niveau d'expression, les spécificités de liaison de ses sites SH2 et ses multiples partenaires protéiques peuvent être mis en cause.

Dans le cas du mélanome, la transformation du mélanocyte original en cellule tumorale passe par une succession d'étapes, au cours desquelles il accumule modifications génétiques et épigénétiques, acquérant des propriétés prolifératrices, migratrices et invasives. Dans ce contexte, SYK fait partie des protéines dont l'expression, présente dans le mélanocyte, est perdue au cours de la transformation tumorale du mélanome (Hoeller et al., 2005; Muthusamy et al., 2006). Mon travail de thèse s'est concentré sur l'identification des mécanismes moléculaires impliqués dans la suppression tumorale exercée par SYK dans le mélanome.

1. L'extinction de SYK favorise un phénotype agressif dans les cellules de mélanome

J'ai donc pu montrer au cours de mon travail de thèse que la perte de SYK au cours de la progression du mélanome participait à l'acquisition d'un phénotype invasif et agressif. La transformation entre le mélanocyte normal résident de la peau et le mélanome métastatique fait intervenir de nombreuses modifications, de l'induction d'oncogènes telles les mutations de BRAF et de NRAS à l'inhibition de suppresseur de tumeurs comme PTEN et p53 (Vultur and Herlyn, 2013). La perte de SYK s'inscrit dans cet éventail d'événements : exprimé dans le mélanocyte, il sert de frein au développement tumoral, capable d'orienter la cellule vers la sénescence en cas de transformation cancéreuse (Bailet et al., 2009). L'extinction de son expression dans la plupart des mélanomes par hyperméthylation de son promoteur levant son effet inhibiteur, promouvant ainsi un phénotype migratoire, invasif et métastatique des cellules de mélanome. Comme il est possible de le voir dans des données publiques comparant l'expression de gènes dans des cultures de mélanocyte et de cellules de mélanome métastatique, issues des travaux de Hoek (GSE4570, **Fig 45a**) et d'Avery (GSE29359, **Fig 45b**), SYK est diminuée ou perdue dans la majorité des mélanomes. Cependant, certains échantillons conservent un niveau d'expression comparable à celui des mélanocytes. Cette distribution des mélanomes entre hauts et bas niveaux de SYK pourrait donc être un indicateur de l'agressivité de la lignée considérée, voire pourrait servir de marqueur de pronostic clinique. Un argument en faveur de cette corrélation entre expression de SYK et agressivité de la lignée peut être apporté par l'étude des lignées de mélanome conservant l'expression de SYK que j'ai pu manipuler au cours de ma thèse, MeWo, Mel501 et Yumm1.7, qui étaient relativement peu migratrices et invasives *in vitro* par rapport à d'autres lignées n'exprimant pas SYK, telles les lignées A375, 1205lu ou B16 (**Fig 54**).

Cette modification phénotypique des cellules s'exprime par un renforcement de la voie des adhésions focales. Lorsque SYK est invalidée, les cellules présentent un plus grand nombre d'adhésions focales, celles-ci étant d'une taille supérieure à celles des cellules exprimant SYK. Cette augmentation implique une meilleure adhésion des cellules à la matrice extracellulaire, et fait sens au vu de mes différents résultats : augmentation de la vitesse d'adhésion et d'étalement des cellules sur fibronectine et collagène, augmentation de la motilité, augmentation de la migration haptotactique et chimiotactique, augmentation de l'invasion 3D d'une matrice de collagène et augmentation de la formation de métastase expérimentale au poumon chez la souris.

Cette augmentation des processus d'adhésion cellule-matrice s'observe au niveau moléculaire par le renforcement de la voie de signalisation de l'adhésion focale lors de l'extinction de SYK, avec l'augmentation d'expression de l'intégrine $\beta 1$, de la taline et de la paxilline, ainsi que l'augmentation

de la phosphorylation de FAK et de SRC. Ceci s'observe dans les lignées humaines de mélanome MeWo et Mel501 et murine Yumm1.7, confirmant que cet effet est reproductible entre des lignées de mélanomes aux statuts mutationnels différents et qu'il se confirme dans des lignées humaines et murines.

De plus, dans les cellules de mélanome déplétées pour SYK, j'ai également observé une augmentation de l'expression de facteurs inducteurs de l'EMT impliqués dans la transition de phénotype du mélanome comme TWIST1, SNAIL et SLUG et de marqueurs du phénotype mésenchymal comme la fibronectine et SPARC. Ces observations supportent l'idée que la perte de SYK dans le mélanome participe à la transition de phénotype, favorisant l'acquisition de traits mésenchymateux conférant des capacités migratoires et invasives exacerbées aux cellules tumorales, comme l'ont montré les travaux de notre laboratoire et d'autres pour la fibronectine (Bittner et al., 2000; Gaggioli et al., 2005), SPARC et SLUG (Fenouille et al., 2012; Tichet et al., 2015). Les cellules MeWo et Mel501 dans lesquelles ces observations ont été faites ont déjà réalisé cette transition mésenchymale avant que je supprime l'expression de SYK, d'autant plus dans les MeWo qui sont issues de métastases. La perte de SYK semble donc pousser encore plus loin les cellules vers le phénotype mésenchymateux. Nous avons réalisé une expérience de puces à ADN pour comparer les profils d'expression de gènes de Mel501 éteintes ou non pour SYK (données non montrées). Parmi les gènes dont l'expression est affectée par l'extinction de SYK, nous avons observé une augmentation de TGF β et de SPARC. Le TGF β est un inducteur bien connu de l'EMT (Gressner et al., 2002; Schnaper et al., 2003; Willis and Borok, 2007) et des transitions semblables à l'EMT comme l'endo-MT (Zeisberg et al., 2007), fournissant un argument supplémentaire en faveur de l'implication de SYK dans la suppression de la transition de phénotype du mélanome. Cependant, de façon inattendue notre expérience d'analyse d'expression de gènes dans les cellules de mélanome déplétées pour SYK ne montre pas d'augmentation significative de l'expression des gènes codant pour les facteurs de l'EMT (données non montrées). Une hypothèse séduisante est que la perte de SYK, en favorisant un axe de signalisation TGF β -SPARC, permettrait l'augmentation des facteurs de l'EMT par une voie AKT-dépendante comme celui décrit par notre laboratoire pour SLUG (Fenouille et al., 2012). A noter qu'un mécanisme commun de stabilisation protéique des facteurs de l'EMT SNAIL, SLUG et TWIST mettant en jeu le système ubiquitine-protéasome et des enzymes de type E3 ubiquitin ligases comme FBXL14 (Ppa) a été décrit (Lander et al., 2011). Il sera intéressant de déterminer dans le futur comment ces mécanismes ou d'autres sont affectés par la présence de SYK dans les cellules de mélanome.

En plus d'une plus grande force d'adhésion mécanique, la perte de SYK dans les cellules de mélanome semble favoriser une meilleure stabilité à la membrane des intégrines, comme le reflète

mon expérience de fractionnement sub-cellulaire et de recyclage forcé de l'intégrine $\beta 1$. Celle-ci subit différentes étapes de glycosylation au cours de sa maturation, passant d'une forme non glycosylée d'environ 90kDa, à une forme intermédiaire hypoglycosylée de 110kDa puis à la forme mature hyperglycosylée de 130kDa. La forme mature se localise à la membrane pour accomplir ses fonctions physiologiques : adhérence et signalisation (Akiyama and Yamada, 1987). Sa présence dans la fraction microsomale implique la fin de sa maturation avant l'export à la membrane ou son internalisation pour recyclage. L'accumulation de la forme mature dans la fraction microsomale lors de la mise en suspension des cellules est une conséquence du recyclage forcé des intégrines $\beta 1$ membranaires. Alors que SYK est exclue de la fraction microsomale dans les cellules adhérentes, elle y est transférée lors du recyclage forcé induit par la mise en suspension. On peut supposer que cette relocalisation est induite par un lien direct ou indirect entre SYK et l'intégrine $\beta 1$, SYK étant entraînée dans la fraction microsomale en même temps que l'intégrine $\beta 1$ et ses complexes associés. Cependant, ce type d'interaction n'a pas été démontré dans le mélanome. Mes résultats de fractionnement supportent l'idée d'une telle interaction : la mise en suspension des cellules de mélanome éteintes pour SYK échouent à relocaliser l'intégrine $\beta 1$ mature de la membrane à la fraction microsomale. Je peux donc proposer SYK comme un agent régulateur du recyclage de l'intégrine $\beta 1$. J'ai également essayé de voir si SYK pouvait directement interagir avec l'intégrine $\beta 1$ dans le mélanome par des expériences de co-immunoprécipitation de SYK et de l'intégrine $\beta 1$, mais aucune interaction directe n'a été détectée (données non montrées). Une interaction entre les domaines SH2 de SYK et les motifs ITAMs portés par les adaptateurs liés aux intégrines tels DAP12 et FcR γ dans les cellules hématopoïétiques est décrite dans la littérature (Mocsai et al., 2010). Il est donc possible que l'interaction entre SYK et l'intégrine $\beta 1$ se fasse indirectement via des adaptateurs de l'intégrine $\beta 1$ comme DAP12 ou FcR γ . Dans ce contexte, mes expériences de co-localisation SYK-intégrine $\beta 1$ par microscopie TIRF indiquent que les deux protéines se localisent dans les mêmes structures membranaires aux fronts de migration des cellules et cela indépendamment des adhésions focales. Cette localisation indiquerait un rôle sensoriel de l'intégrine $\beta 1$ dans le cadre du mélanome, comme il a déjà pu être décrit dans d'autres modèles (Ribeiro et al., 2013), pouvant générer ensuite la formation d'adhésions focales (Case and Waterman, 2015; Geiger et al., 2009). Le renforcement de ce rôle sensoriel par le défaut de recyclage induit par la perte de SYK pourrait donc favoriser l'adhésion dépendante du signal sensoriel de l'intégrine $\beta 1$, générant conséquemment plus d'adhésions focales et étant responsable du phénotype plus motile des cellules de mélanome éteintes pour SYK.

Ce rôle d'adaptateur de SYK via ses domaines SH2 dans la signalisation ou le recyclage de l'intégrine $\beta 1$ est également supporté par l'impact identique sur la migration et la formation de métastases de la forme inactive pour son activité kinase de SYK par rapport à sa forme sauvage (**fig**

50). Ainsi son activité kinase ne semble pas essentielle à la suppression tumorale induite par SYK dans le mélanome, renforçant l'idée d'un rôle adaptateur de SYK dans la suppression de l'invasion. Le laboratoire a identifié par la technique de double hybride dans la levure la protéine NCK qui est connue pour être impliquée dans la prolifération, la migration et l'invasion des cellules de mélanome (Labelle-Cote et al., 2011), et plus largement pour participer à la polarisation migratoire cellulaire (Chaki et al., 2013; Funasaka et al., 2010), à la signalisation des intégrines et le renouvellement des adhésions focales (Buday et al., 2002; Stoletov et al., 2004). Dans ce contexte, l'interaction SYK-NCK pourrait piéger NCK et bloquer sa fonction adaptatrice, aboutissant à une plus faible signalisation de l'intégrine $\beta 1$ et des capacités adhésives et migratoires des cellules de mélanome. La perte de SYK durant la progression métastatique du mélanome augmenterait la quantité de NCK libre d'interagir avec des protéines des adhésions focales (comme p130CAS phosphorylée ou PINCH) ou du remodelage de l'actine (comme la kinase PAK1), et favoriserait un phénotype plus motile et invasif. L'interaction entre SYK et NCK ainsi que la co-localisation de SYK et de l'intégrine $\beta 1$ à la membrane des cellules de mélanome sont donc des pistes intéressantes à explorer afin de préciser par quels mécanismes moléculaires un haut niveau d'expression de SYK peut se traduire par une atténuation du phénotype mésenchymal invasif des cellules tumorales. Il serait également intéressant de déterminer si de tels mécanismes sont également à l'œuvre dans les mélanocytes exprimant SYK.

2. La délétion de *Syk* dans les mélanocytes de souris augmente l'invasion tumorale induite par l'oncogène $BRAF^{V600E}$ et la perte du suppresseur de tumeur PTEN

Les modèles animaux d'inactivation conditionnelle de SYK chez la souris (cKO) que j'ai établis au cours de ma thèse ont permis d'investiguer le rôle de SYK dans l'homéostasie du mélanocyte et sa transformation maligne en mélanome.

Afin d'exciser de façon constitutive le gène *Syk* dans les mélanocytes de souris, nous avons utilisé le modèle transgénique *Tyr::Cre* qui permet l'expression de la recombinaison Cre à 11,5 jours du développement embryonnaire (Delmas et al., 2003). Le croisement de ces animaux avec nos souris *Syk^{flox/flox}* montre que la perte de SYK dans le lignage mélanocytaire n'affecte pas de façon notable l'aspect macroscopique de la peau des souris, la localisation cutanée des mélanocytes et la pigmentation du pelage. Ces dernières observations ayant été réalisées visuellement de manière qualitative, il se pourrait toutefois que de subtiles différences en terme de richesse ou de balance en pigment ou dans la formation des mélanosomes aient pu nous échapper. Afin de caractériser plus avant ces mélanocytes issus des animaux *Tyr::Cre;Syk^{flox/flox}* il pourrait être intéressant de doser précisément les mélanines des poils ou encore d'extraire et cultiver des mélanocytes cutanés pour réaliser une meilleure caractérisation *in vitro*. Il sera également intéressant de déterminer si

l'ablation de Syk dans les mélanocytes peut affecter la réponse inflammatoire cutanée des animaux $Tyr::Cre;Syk^{flox/flox}$.

Les souris $Tyr::Cre;Syk^{flox/flox}$ ne semblent pas non plus présenter une altération de la réponse à l'irradiation UV dans les conditions expérimentales que j'ai utilisées. Ainsi, la perte de SYK ne semble pas être capable d'induire à elle seule une transformation des mélanocytes en mélanome et ce même après une induction UV. Il est décrit dans la littérature que l'oncogène $BRAF^{V600E}$ exprimé dans les mélanocytes chez la souris n'induit la transformation de mélanocytes en mélanome qu'après exposition aux UV (Viros et al., 2014). Il sera donc important de déterminer dans le futur si la perte de SYK dans les mélanocytes, associée à une exposition aux UV peut renforcer le signal oncogénique de la mutation $BRAF^{V600E}$, en favorisant le processus de sénescence mélanocytaire (Bailet et al. 2009 ; Deckert & Tartare-Deckert 2014) et l'apparition de naevi.

Afin de préciser le rôle de SYK dans le développement du mélanome chez la souris, nous avons utilisé un modèle de transformation tumorale inductible au tamoxifène dans les animaux $Tyr::CreERT2;Braf^{dSLV600E/+};Pten^{flox/flox}$ croisés ou non avec nos souris $Syk^{flox/flox}$. Alors que les animaux $Tyr::CreERT2;Braf^{dSLV600E/+};Pten^{flox/flox}$ (Dankort et al., 2009; Dhomen et al., 2009; Yajima et al., 2006) développent déjà spontanément des mélanomes après application topique de tamoxifène sur le dos des animaux, l'ablation de SYK dans ce modèle accélère la prolifération et l'invasion cutanée, ainsi que la fibrose cutanée. Nos observations qui restent préliminaires semblent toutefois confirmer le rôle de SYK dans la suppression tumorale du mélanome. Il reste aussi à déterminer si les mélanomes $BRAF^{V600E}$; $PTEN^{neg}$; SYK^{neg} induits chez la souris possèdent les mêmes modifications phénotypiques et fonctionnelles que les lignées déplétées de SYK *in vitro*.

Notre protocole d'application de tamoxifène a provoqué une réaction extrêmement forte et rapide, avec une apparition massive de mélanome 1 mois après la première application. Ainsi, s'il a tout de même pu être observée une augmentation de la prolifération, de l'invasion et de la fibrose, des subtilités dans la réponse nous ont peut-être échappées. Par exemple, seuls les animaux $Tyr::CreERT2;Braf^{dSLV600E/+};Pten^{flox/flox}$ et $Tyr::CreERT2;Braf^{dSLV600E/+};Pten^{flox/flox};Syk^{flox/flox}$ ont développé des mélanomes dans notre expérience, mais peut-être que les animaux $Tyr::CreERT2;Pten^{flox/flox};Syk^{flox/flox}$ et $Tyr::CreERT2;Braf^{dSLV600E};Syk^{flox/flox}$ auraient pu en développer avec plus de temps, ou en conjuguant l'induction au tamoxifène avec une exposition aux UV. Une autre limite de notre protocole fut l'application large du tamoxifène sur le dos des animaux, provoquant l'apparition de nombreuses tumeurs primaires cutanées et l'hyperpigmentation de la queue, des pattes, du museau et de la zone ano-génitale des animaux $Tyr::CreERT2;Braf^{dSLV600E/+};Pten^{flox/flox}$ et $Tyr::CreERT2;Braf^{dSLV600E/+};Pten^{flox/flox};Syk^{flox/flox}$ après ingestion du tamoxifène lors de la toilette. En appliquant le tamoxifène de manière plus restreinte, nous pourrions induire un seul site primaire, et

ainsi pouvoir observer plus précisément le développement métastatique des mélanomes induits. De cette façon, il serait possible d'exciser la tumeur primaire lorsque sa taille atteint les limites éthiques et ainsi prolonger le temps d'observation du développement métastatique. A noter que la peau de la queue des souris présente des mélanocytes en dehors des bulbes pileux, similaire à la peau humaine. L'induction d'une tumeur primaire sur la queue pourrait donc constituer un modèle encore plus proche physiologiquement de la pathologie humaine.

Enfin, nos observations effectuées sur la lignée murine de mélanome primaire YUMM1.7 suggèrent une coopération importante entre *Syk* et le gène suppresseur de tumeur *Cdkn2a*. En effet, la déplétion de SYK dans les cellules YUMM1.7 (de génotype *Braf*^{V600E}; *Cdkn2a*^{-/-}; *Pten*^{-/-}) induit une augmentation dramatique des capacités migratoires et invasives des cellules, associée à une transition phénotypique de type EMT et une augmentation de la signalisation de l'intégrine $\beta 1$. Il sera donc très intéressant d'étudier aussi l'impact de l'ablation de *Syk* sur le développement métastatique du mélanome chez les animaux *Braf*^{V600E}; *Cdkn2a*^{-/-}.

3. Conclusion

Mon travail de thèse a pu mettre en évidence l'importance de SYK pour la transformation tumorale des mélanocytes en mélanome, sur la base de données obtenues à partir de lignées cellulaires humaines et murines et de modèles d'inactivation conditionnelle du gène *Syk* dans les mélanocytes chez la souris. La perte de SYK au cours de la mélanomagenèse n'est pas un événement "moteur" de la transformation par lui-même, mais contribue parmi les nombreuses modifications génétiques et épigénétiques à l'acquisition d'un phénotype migratoire et invasif, participant à la production de métastases.

Mes travaux confirment donc le rôle de suppresseur de tumeur du gène *Syk*, en particulier au travers de son activité de type adaptateur capable d'atténuer la signalisation de l'intégrine $\beta 1$ et le développement de traits mésenchymateux associés à des capacités invasives accrues. Le gène *Syk* n'est toutefois pas perdu dans tous les échantillons et lignées de mélanome. Les travaux précédents de notre laboratoire ont montré que SYK est majoritairement perdu suite à l'hyperméthylation de son promoteur (Bailet et al. 2009). La question du ou des mécanismes conduisant à son inactivation par hyperméthylation au cours de la mélanomagenèse reste donc posée. Dans ce contexte, une étude récente, montrant que l'hypoxie tumorale conduit à l'hyperméthylation de nombreux gènes parmi lesquels SYK dans plusieurs lignées humaines et murines (Thienpont et al., 2016), constitue une piste qui devra être explorée.

REFERENCES

VII. Références

- Abram, C.L., and Lowell, C.A. (2007). The expanding role for ITAM-based signaling pathways in immune cells. *Sci STKE* 2007, re2.
- Abtahian, F., Guerriero, A., Sebzda, E., Lu, M.M., Zhou, R., Mocsai, A., Myers, E.E., Huang, B., Jackson, D.G., Ferrari, V.A., et al. (2003). Regulation of blood and lymphatic vascular separation by signaling proteins SLP-76 and Syk. *Science* 299, 247-251.
- Abudula, A., Grabbe, A., Brechmann, M., Polaschegg, C., Herrmann, N., Goldbeck, I., Dittmann, K., and Wienands, J. (2007). SLP-65 signal transduction requires Src homology 2 domain-mediated membrane anchoring and a kinase-independent adaptor function of Syk. *The Journal of biological chemistry* 282, 29059-29066.
- Aceto, N., Bardia, A., Miyamoto, D.T., Donaldson, M.C., Wittner, B.S., Spencer, J.A., Yu, M., Pely, A., Engstrom, A., Zhu, H., et al. (2014). Circulating tumor cell clusters are oligoclonal precursors of breast cancer metastasis. *Cell* 158, 1110-1122.
- Acloque, H., Adams, M.S., Fishwick, K., Bronner-Fraser, M., and Nieto, M.A. (2009). Epithelial-mesenchymal transitions: the importance of changing cell state in development and disease. *The Journal of clinical investigation* 119, 1438-1449.
- Adachi, T., Wienands, J., Tsubata, T., and Kurosaki, T. (2007). Interdomain A is crucial for ITAM-dependent and -independent regulation of Syk. *Biochemical and biophysical research communications* 364, 111-117.
- Ahmed, N., Maines-Bandiera, S., Quinn, M.A., Unger, W.G., Dedhar, S., and Auersperg, N. (2006). Molecular pathways regulating EGF-induced epithelio-mesenchymal transition in human ovarian surface epithelium. *American journal of physiology Cell physiology* 290, C1532-1542.
- Akiyama, S.K., and Yamada, K.M. (1987). Biosynthesis and acquisition of biological activity of the fibronectin receptor. *The Journal of biological chemistry* 262, 17536-17542.
- Albiges-Rizo, C., Destaing, O., Fourcade, B., Planus, E., and Block, M.R. (2009). Actin machinery and mechanosensitivity in invadopodia, podosomes and focal adhesions. *Journal of cell science* 122, 3037-3049.
- Albino, A.P., Le Strange, R., Oliff, A.I., Furth, M.E., and Old, L.J. (1984). Transforming ras genes from human melanoma: a manifestation of tumour heterogeneity? *Nature* 308, 69-72.
- Albino, A.P., Vidal, M.J., McNutt, N.S., Shea, C.R., Prieto, V.G., Nanus, D.M., Palmer, J.M., and Hayward, N.K. (1994). Mutation and expression of the p53 gene in human malignant melanoma. *Melanoma Res* 4, 35-45.
- Albregues, J., Bertero, T., Grasset, E., Bonan, S., Maiel, M., Bourget, I., Philippe, C., Herraiz Serrano, C., Benamar, S., Croce, O., et al. (2015). Epigenetic switch drives the conversion of fibroblasts into proinvasive cancer-associated fibroblasts. *Nature communications* 6, 10204.
- All-Ericsson, C., Girnita, L., Seregard, S., Bartolazzi, A., Jager, M.J., and Larsson, O. (2002). Insulin-like growth factor-1 receptor in uveal melanoma: a predictor for metastatic disease and a potential therapeutic target. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 43, 1-8.
- Aller, S.G., Yu, J., Ward, A., Weng, Y., Chittaboina, S., Zhuo, R., Harrell, P.M., Trinh, Y.T., Zhang, Q., Urbatsch, I.L., et al. (2009). Structure of P-glycoprotein reveals a molecular basis for poly-specific drug binding. *Science* 323, 1718-1722.
- Alon, R., and Dustin, M.L. (2007). Force as a facilitator of integrin conformational changes during leukocyte arrest on blood vessels and antigen-presenting cells. *Immunity* 26, 17-27.
- Alonso, S.R., Tracey, L., Ortiz, P., Perez-Gomez, B., Palacios, J., Pollan, M., Linares, J., Serrano, S., Saez-Castillo, A.I., Sanchez, L., et al. (2007). A high-throughput study in melanoma identifies epithelial-mesenchymal transition as a major determinant of metastasis. *Cancer research* 67, 3450-3460.
- Anastas, J.N., Kulikauskas, R.M., Tamir, T., Rizos, H., Long, G.V., von Euw, E.M., Yang, P.T., Chen, H.W., Haydu, L., Toroni, R.A., et al. (2014). WNT5A enhances resistance of melanoma cells to targeted BRAF inhibitors. *The Journal of clinical investigation* 124, 2877-2890.
- Anastasiadis, P.Z., and Reynolds, A.B. (2001). Regulation of Rho GTPases by p120-catenin. *Current opinion in cell biology* 13, 604-610.
- Arribas, A.J., Gomez-Abad, C., Sanchez-Beato, M., Martinez, N., Dilisio, L., Casado, F., Cruz, M.A., Algara, P., Piris, M.A., and Mollejo, M. (2013). Splenic marginal zone lymphoma: comprehensive analysis of gene expression and miRNA profiling. *Mod Pathol* 26, 889-901.
- Artym, V.V., Zhang, Y., Seillier-Moiseiwitsch, F., Yamada, K.M., and Mueller, S.C. (2006). Dynamic interactions of cortactin and membrane type 1 matrix metalloproteinase at invadopodia: defining the stages of invadopodia formation and function. *Cancer research* 66, 3034-3043.

- Ascierto, P.A., Schadendorf, D., Berking, C., Agarwala, S.S., van Herpen, C.M., Queirolo, P., Blank, C.U., Hauschild, A., Beck, J.T., St-Pierre, A., et al. (2013). MEK162 for patients with advanced melanoma harbouring NRAS or Val600 BRAF mutations: a non-randomised, open-label phase 2 study. *Lancet Oncol* 14, 249-256.
- Asselin-Labat, M.L., Sutherland, K.D., Barker, H., Thomas, R., Shackleton, M., Forrest, N.C., Hartley, L., Robb, L., Grosveld, F.G., van der Wees, J., et al. (2007). Gata-3 is an essential regulator of mammary-gland morphogenesis and luminal-cell differentiation. *Nat Cell Biol* 9, 201-209.
- Attieh, Y., and Vignjevic, D.M. (2016). The hallmarks of CAFs in cancer invasion. *Eur J Cell Biol*.
- Avgustinova, A., Iravani, M., Robertson, D., Fearn, A., Gao, Q., Klingbeil, P., Hanby, A.M., Speirs, V., Sahai, E., Calvo, F., et al. (2016). Tumour cell-derived Wnt7a recruits and activates fibroblasts to promote tumour aggressiveness. *Nature communications* 7, 10305.
- Bach, M.P., Hug, E., Werner, M., Holch, J., Sprissler, C., Pechloff, K., Zirlik, K., Zeiser, R., Dierks, C., Ruland, J., et al. (2014). Premature terminal differentiation protects from deregulated lymphocyte activation by ITK-Syk. *Journal of immunology* 192, 1024-1033.
- Bagorda, A., and Parent, C.A. (2008). Eukaryotic chemotaxis at a glance. *Journal of cell science* 121, 2621-2624.
- Bailet, O., Fenouille, N., Abbe, P., Robert, G., Rocchi, S., Gonthier, N., Denoyelle, C., Ticchioni, M., Ortonne, J.P., Ballotti, R., et al. (2009). Spleen tyrosine kinase functions as a tumor suppressor in melanoma cells by inducing senescence-like growth arrest. *Cancer research* 69, 2748-2756.
- Baker, C.V., Bronner-Fraser, M., Le Douarin, N.M., and Teillet, M.A. (1997). Early- and late-migrating cranial neural crest cell populations have equivalent developmental potential in vivo. *Development* 124, 3077-3087.
- Balaban, N.Q., Schwarz, U.S., Riveline, D., Goichberg, P., Tzur, G., Sabanay, I., Mahalu, D., Safran, S., Bershadsky, A., Addadi, L., et al. (2001). Force and focal adhesion assembly: a close relationship studied using elastic micropatterned substrates. *Nat Cell Biol* 3, 466-472.
- Ball, N.J., Yohn, J.J., Morelli, J.G., Norris, D.A., Golitz, L.E., and Hoeffler, J.P. (1994). Ras mutations in human melanoma: a marker of malignant progression. *The Journal of investigative dermatology* 102, 285-290.
- Balsamo, M., Scordamaglia, F., Pietra, G., Manzini, C., Cantoni, C., Boitano, M., Queirolo, P., Vermi, W., Facchetti, F., Moretta, A., et al. (2009). Melanoma-associated fibroblasts modulate NK cell phenotype and antitumor cytotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 20847-20852.
- Banno, A., and Ginsberg, M.H. (2008). Integrin activation. *Biochem Soc Trans* 36, 229-234.
- Barczyk, M., Carracedo, S., and Gullberg, D. (2010). Integrins. *Cell Tissue Res* 339, 269-280.
- Barkett, M., and Gilmore, T.D. (1999). Control of apoptosis by Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene* 18, 6910-6924.
- Barrallo-Gimeno, A., and Nieto, M.A. (2005). The Snail genes as inducers of cell movement and survival: implications in development and cancer. *Development* 132, 3151-3161.
- Barretina, J., Caponigro, G., Stransky, N., Venkatesan, K., Margolin, A.A., Kim, S., Wilson, C.J., Lehar, J., Kryukov, G.V., Sonkin, D., et al. (2012). The Cancer Cell Line Encyclopedia enables predictive modelling of anticancer drug sensitivity. *Nature* 483, 603-607.
- Bates, R.C., Bellovin, D.I., Brown, C., Maynard, E., Wu, B., Kawakatsu, H., Sheppard, D., Oettgen, P., and Mercurio, A.M. (2005). Transcriptional activation of integrin beta6 during the epithelial-mesenchymal transition defines a novel prognostic indicator of aggressive colon carcinoma. *The Journal of clinical investigation* 115, 339-347.
- Battle, E., Sancho, E., Franci, C., Dominguez, D., Monfar, M., Baulida, J., and Garcia De Herreros, A. (2000). The transcription factor snail is a repressor of E-cadherin gene expression in epithelial tumour cells. *Nat Cell Biol* 2, 84-89.
- Baudot, A.D., Jeandel, P.Y., Mouska, X., Maurer, U., Tartare-Deckert, S., Raynaud, S.D., Cassuto, J.P., Ticchioni, M., and Deckert, M. (2009). The tyrosine kinase Syk regulates the survival of chronic lymphocytic leukemia B cells through PKCdelta and proteasome-dependent regulation of Mcl-1 expression. *Oncogene* 28, 3261-3273.
- Bauer, A.L., Jackson, T.L., and Jiang, Y. (2009). Topography of extracellular matrix mediates vascular morphogenesis and migration speeds in angiogenesis. *PLoS Comput Biol* 5, e1000445.
- Bax, N.A., Pijnappels, D.A., van Oorschot, A.A., Winter, E.M., de Vries, A.A., van Tuyn, J., Braun, J., Maas, S., Schali, M.J., Atsma, D.E., et al. (2011). Epithelial-to-mesenchymal transformation alters electrical conductivity of human epicardial cells. *J Cell Mol Med* 15, 2675-2683.
- Beaune, G., Stirbat, T.V., Khalifat, N., Cochet-Escartin, O., Garcia, S., Gurchenkov, V.V., Murrell, M.P., Dufour, S., Cuvelier, D., and Brochard-Wyart, F. (2014). How cells flow in the spreading of cellular aggregates. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111, 8055-8060.

- Beitz, L.O., Fruman, D.A., Kurosaki, T., Cantley, L.C., and Scharenberg, A.M. (1999). SYK is upstream of phosphoinositide 3-kinase in B cell receptor signaling. *The Journal of biological chemistry* 274, 32662-32666.
- Belguise, K., Guo, S., and Sonenshein, G.E. (2007). Activation of FOXO3a by the green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate induces estrogen receptor alpha expression reversing invasive phenotype of breast cancer cells. *Cancer research* 67, 5763-5770.
- Belkin, A.M., and Stepp, M.A. (2000). Integrins as receptors for laminins. *Microsc Res Tech* 51, 280-301.
- Bennett, D.C. (2003). Human melanocyte senescence and melanoma susceptibility genes. *Oncogene* 22, 3063-3069.
- Bennett, D.C. (2008). How to make a melanoma: what do we know of the primary clonal events? *Pigment cell & melanoma research* 21, 27-38.
- Bergers, G., and Benjamin, L.E. (2003). Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nature reviews Cancer* 3, 401-410.
- Bergert, M., Chandradoss, S.D., Desai, R.A., and Paluch, E. (2012). Cell mechanics control rapid transitions between blebs and lamellipodia during migration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, 14434-14439.
- Berlin, C., Berg, E.L., Briskin, M.J., Andrew, D.P., Kilshaw, P.J., Holzmann, B., Weissman, I.L., Hamann, A., and Butcher, E.C. (1993). Alpha 4 beta 7 integrin mediates lymphocyte binding to the mucosal vascular addressin MAdCAM-1. *Cell* 74, 185-195.
- Bernstein, B.E., Mikkelsen, T.S., Xie, X., Kamal, M., Huebert, D.J., Cuff, J., Fry, B., Meissner, A., Wernig, M., Plath, K., et al. (2006). A bivalent chromatin structure marks key developmental genes in embryonic stem cells. *Cell* 125, 315-326.
- Bertolotto, C., Abbe, P., Hemesath, T.J., Bille, K., Fisher, D.E., Ortonne, J.P., and Ballotti, R. (1998). Microphthalmia gene product as a signal transducer in cAMP-induced differentiation of melanocytes. *The Journal of cell biology* 142, 827-835.
- Berton, G., Mocsai, A., and Lowell, C.A. (2005). Src and Syk kinases: key regulators of phagocytic cell activation. *Trends Immunol* 26, 208-214.
- Billottet, C., Tuefferd, M., Gentien, D., Rapinat, A., Thiery, J.P., Broet, P., and Jouanneau, J. (2008). Modulation of several waves of gene expression during FGF-1 induced epithelial-mesenchymal transition of carcinoma cells. *J Cell Biochem* 104, 826-839.
- Bissell, M.J., and Hines, W.C. (2011). Why don't we get more cancer? A proposed role of the microenvironment in restraining cancer progression. *Nat Med* 17, 320-329.
- Bittner M, Meltzer P, Chen Y, Jiang Y, Seftor E, Hendrix M, Radmacher M, Simon R, Yakhini Z, Ben-Dor A, Sampas N, Dougherty E, Wang E, Marincola F, Gooden C, Lueders J, Glatfelter A, Pollock P, Carpten J, Gillanders E, Leja D, Dietrich K, Beaudry C, Berens M, Alberts D, Sondak V. Molecular classification of cutaneous malignant melanoma by gene expression profiling. *Nature*. 2000 Aug 3;406(6795):536-40.
- Blancato, J., Graves, A., Rashidi, B., Moroni, M., Tchobe, L., Ozdemirli, M., Kallakury, B., Makambi, K.H., Marian, C., and Mueller, S.C. (2014). SYK allelic loss and the role of Syk-regulated genes in breast cancer survival. *PLoS One* 9, e87610.
- Blanpain, C., and Fuchs, E. (2014). Stem cell plasticity. Plasticity of epithelial stem cells in tissue regeneration. *Science* 344, 1242281.
- Bliss, J.M., Ford, D., Swerdlow, A.J., Armstrong, B.K., Cristofolini, M., Elwood, J.M., Green, A., Holly, E.A., Mack, T., MacKie, R.M., et al. (1995). Risk of cutaneous melanoma associated with pigmentation characteristics and freckling: systematic overview of 10 case-control studies. The International Melanoma Analysis Group (IMAGE). *International journal of cancer Journal international du cancer* 62, 367-376.
- Block, M.R., Badowski, C., Millon-Fremillon, A., Bouvard, D., Bouin, A.P., Faurobert, E., Gerber-Scokaert, D., Planus, E., and Albiges-Rizo, C. (2008). Podosome-type adhesions and focal adhesions, so alike yet so different. *Eur J Cell Biol* 87, 491-506.
- Blouw, B., Seals, D.F., Pass, I., Diaz, B., and Courtneidge, S.A. (2008). A role for the podosome/invadopodia scaffold protein Tks5 in tumor growth in vivo. *Eur J Cell Biol* 87, 555-567.
- Bochner, B.S., Lusinskas, F.W., Gimbrone, M.A., Jr., Newman, W., Sterbinsky, S.A., Derse-Anthony, C.P., Klunk, D., and Schleimer, R.P. (1991). Adhesion of human basophils, eosinophils, and neutrophils to interleukin 1-activated human vascular endothelial cells: contributions of endothelial cell adhesion molecules. *The Journal of experimental medicine* 173, 1553-1557.
- Bottcher, R.T., Stremmel, C., Meves, A., Meyer, H., Widmaier, M., Tseng, H.Y., and Fassler, R. (2012). Sorting nexin 17 prevents lysosomal degradation of beta1 integrins by binding to the beta1-integrin tail. *Nat Cell Biol* 14, 584-592.

- Brabletz, T., Jung, A., Reu, S., Porzner, M., Hlubek, F., Kunz-Schughart, L.A., Knuechel, R., and Kirchner, T. (2001). Variable beta-catenin expression in colorectal cancers indicates tumor progression driven by the tumor environment. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 10356-10361.
- Bracher, A., Cardona, A.S., Tauber, S., Fink, A.M., Steiner, A., Pehamberger, H., Niederleithner, H., Petzelbauer, P., Groger, M., and Loewe, R. (2013). Epidermal growth factor facilitates melanoma lymph node metastasis by influencing tumor lymphangiogenesis. *The Journal of investigative dermatology* 133, 230-238.
- Braeutigam, C., Rago, L., Rolke, A., Waldmeier, L., Christofori, G., and Winter, J. (2014). The RNA-binding protein Rbfox2: an essential regulator of EMT-driven alternative splicing and a mediator of cellular invasion. *Oncogene* 33, 1082-1092.
- Bremnes, R.M., Donnem, T., Al-Saad, S., Al-Shibli, K., Andersen, S., Sirera, R., Camps, C., Marinez, I., and Busund, L.T. (2011). The role of tumor stroma in cancer progression and prognosis: emphasis on carcinoma-associated fibroblasts and non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol* 6, 209-217.
- Bresnick, E.H., Lee, H.Y., Fujiwara, T., Johnson, K.D., and Keles, S. (2010). GATA switches as developmental drivers. *The Journal of biological chemistry* 285, 31087-31093.
- Bridgewater, R.E., Norman, J.C., and Caswell, P.T. (2012). Integrin trafficking at a glance. *Journal of cell science* 125, 3695-3701.
- Brieher, W.M., and Yap, A.S. (2013). Cadherin junctions and their cytoskeleton(s). *Current opinion in cell biology* 25, 39-46.
- Briscoe, J., and Therond, P.P. (2013). The mechanisms of Hedgehog signalling and its roles in development and disease. *Nature reviews Molecular cell biology* 14, 416-429.
- Brosh, R., and Rotter, V. (2009). When mutants gain new powers: news from the mutant p53 field. *Nature reviews Cancer* 9, 701-713.
- Buccione, R., Caldieri, G., and Ayala, I. (2009). Invadopodia: specialized tumor cell structures for the focal degradation of the extracellular matrix. *Cancer Metastasis Rev* 28, 137-149.
- Buchner, M., Fuchs, S., Prinz, G., Pfeifer, D., Bartholome, K., Burger, M., Chevalier, N., Vallat, L., Timmer, J., Gribben, J.G., et al. (2009). Spleen tyrosine kinase is overexpressed and represents a potential therapeutic target in chronic lymphocytic leukemia. *Cancer research* 69, 5424-5432.
- Buday L, Wunderlich L, Tamás P. The Nck family of adapter proteins: regulators of actin cytoskeleton. *Cell Signal*. 2002 Sep;14(9):723-31.
- Burnette, D.T., Manley, S., Sengupta, P., Sougrat, R., Davidson, M.W., Kachar, B., and Lippincott-Schwartz, J. (2011). A role for actin arcs in the leading-edge advance of migrating cells. *Nat Cell Biol* 13, 371-381.
- Burnette, D.T., Shao, L., Ott, C., Pasapera, A.M., Fischer, R.S., Baird, M.A., Der Loughian, C., Delanoe-Ayari, H., Paszek, M.J., Davidson, M.W., et al. (2014). A contractile and counterbalancing adhesion system controls the 3D shape of crawling cells. *The Journal of cell biology* 205, 83-96.
- Byers, H.R., Dykstra, S.G., and Boissel, S.J. (2007). Requirement of dynactin p150(Glued) subunit for the functional integrity of the keratinocyte microparasol. *The Journal of investigative dermatology* 127, 1736-1744.
- Byron, A., Humphries, J.D., Bass, M.D., Knight, D., and Humphries, M.J. (2011). Proteomic analysis of integrin adhesion complexes. *Science signaling* 4, pt2.
- Cagnet, S., Faraldo, M.M., Kreft, M., Sonnenberg, A., Raymond, K., and Glukhova, M.A. (2014). Signaling events mediated by alpha3beta1 integrin are essential for mammary tumorigenesis. *Oncogene* 33, 4286-4295.
- Cai, D., and Montell, D.J. (2014). Diverse and dynamic sources and sinks in gradient formation and directed migration. *Current opinion in cell biology* 30, 91-98.
- Calderwood, D.A., Fujioka, Y., de Pereda, J.M., Garcia-Alvarez, B., Nakamoto, T., Margolis, B., McGlade, C.J., Liddington, R.C., and Ginsberg, M.H. (2003). Integrin beta cytoplasmic domain interactions with phosphotyrosine-binding domains: a structural prototype for diversity in integrin signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 2272-2277.
- Caldwell, R.G., Wilson, J.B., Anderson, S.J., and Longnecker, R. (1998). Epstein-Barr virus LMP2A drives B cell development and survival in the absence of normal B cell receptor signals. *Immunity* 9, 405-411.
- Calvo, F., Ege, N., Grande-Garcia, A., Hooper, S., Jenkins, R.P., Chaudhry, S.I., Harrington, K., Williamson, P., Moeendarbary, E., Charras, G., et al. (2013). Mechanotransduction and YAP-dependent matrix remodelling is required for the generation and maintenance of cancer-associated fibroblasts. *Nat Cell Biol* 15, 637-646.
- Campbell, K., Whissell, G., Franch-Marro, X., Batlle, E., and Casanova, J. (2011). Specific GATA factors act as conserved inducers of an endodermal-EMT. *Developmental cell* 21, 1051-1061.

- Camper, L., Holmval, K., Wangnerud, C., Aszodi, A., and Lundgren-Akerlund, E. (2001). Distribution of the collagen-binding integrin $\alpha 10\beta 1$ during mouse development. *Cell Tissue Res* 306, 107-116.
- Canonici, A., Steelant, W., Rigot, V., Khomitch-Baud, A., Boutaghou-Cherid, H., Bruyneel, E., Van Roy, F., Garrouste, F., Pommier, G., and Andre, F. (2008). Insulin-like growth factor-I receptor, E-cadherin and αv integrin form a dynamic complex under the control of α -catenin. *International journal of cancer Journal international du cancer* 122, 572-582.
- Caramel, J., Papadogeorgakis, E., Hill, L., Browne, G.J., Richard, G., Wierinckx, A., Saldanha, G., Osborne, J., Hutchinson, P., Tse, G., et al. (2013). A switch in the expression of embryonic EMT-inducers drives the development of malignant melanoma. *Cancer cell* 24, 466-480.
- Carmona-Fontaine, C., Matthews, H.K., Kuriyama, S., Moreno, M., Dunn, G.A., Parsons, M., Stern, C.D., and Mayor, R. (2008). Contact inhibition of locomotion in vivo controls neural crest directional migration. *Nature* 456, 957-961.
- Carnevale, J., Ross, L., Puissant, A., Banerji, V., Stone, R.M., DeAngelo, D.J., Ross, K.N., and Stegmaier, K. (2013). SYK regulates mTOR signaling in AML. *Leukemia* 27, 2118-2128.
- Carter, S.B. (1967). Haptotaxis and the mechanism of cell motility. *Nature* 213, 256-260.
- Case, L.B., and Waterman, C.M. (2015). Integration of actin dynamics and cell adhesion by a three-dimensional, mechanosensitive molecular clutch. *Nat Cell Biol* 17, 955-963.
- Caswell, P.T., and Norman, J.C. (2006). Integrin trafficking and the control of cell migration. *Traffic* 7, 14-21.
- Cavallaro, U., and Christofori, G. (2004). Cell adhesion and signalling by cadherins and Ig-CAMs in cancer. *Nature reviews Cancer* 4, 118-132.
- Chaki, S.P., Barhoumi, R., Berginski, M.E., Sreenivasappa, H., Trache, A., Gomez, S.M., and Rivera, G.M. (2013). Nck enables directional cell migration through the coordination of polarized membrane protrusion with adhesion dynamics. *Journal of cell science* 126, 1637-1649.
- Chalkiadaki, G., Nikitovic, D., Berdiaki, A., Sifaki, M., Krasagakis, K., Katonis, P., Karamanos, N.K., and Tzanakakis, G.N. (2009). Fibroblast growth factor-2 modulates melanoma adhesion and migration through a syndecan-4-dependent mechanism. *The international journal of biochemistry & cell biology* 41, 1323-1331.
- Chan, K.T., Asokan, S.B., King, S.J., Bo, T., Dubose, E.S., Liu, W., Berginski, M.E., Simon, J.M., Davis, I.J., Gomez, S.M., et al. (2014). LKB1 loss in melanoma disrupts directional migration toward extracellular matrix cues. *The Journal of cell biology* 207, 299-315.
- Chandarlapaty, S., Sawai, A., Scaltriti, M., Rodrik-Outmezguine, V., Grbovic-Huezo, O., Serra, V., Majumder, P.K., Baselga, J., and Rosen, N. (2011). AKT inhibition relieves feedback suppression of receptor tyrosine kinase expression and activity. *Cancer cell* 19, 58-71.
- Chang, B.D., Watanabe, K., Broude, E.V., Fang, J., Poole, J.C., Kalinichenko, T.V., and Roninson, I.B. (2000). Effects of p21Waf1/Cip1/Sdi1 on cellular gene expression: implications for carcinogenesis, senescence, and age-related diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 4291-4296.
- Chang, T.H., Tsai, M.F., Su, K.Y., Wu, S.G., Huang, C.P., Yu, S.L., Yu, Y.L., Lan, C.C., Yang, C.H., Lin, S.B., et al. (2011). Slug confers resistance to the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor. *Am J Respir Crit Care Med* 183, 1071-1079.
- Chartrain, M., Riond, J., Stennevin, A., Vandenberghe, I., Gomes, B., Lamant, L., Meyer, N., Gairin, J.E., Guilbaud, N., and Annereau, J.P. (2012). Melanoma chemotherapy leads to the selection of ABCB5-expressing cells. *PLoS One* 7, e36762.
- Chellaiah, M.A., and Hruska, K.A. (2003). The integrin $\alpha(v)\beta(3)$ and CD44 regulate the actions of osteopontin on osteoclast motility. *Calcif Tissue Int* 72, 197-205.
- Chen, C.S., Tan, J., and Tien, J. (2004). Mechanotransduction at cell-matrix and cell-cell contacts. *Annu Rev Biomed Eng* 6, 275-302.
- Chen, L., Huynh, L., Apgar, J., Tang, L., Rassenti, L., Weiss, A., and Kipps, T.J. (2008a). ZAP-70 enhances IgM signaling independent of its kinase activity in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 111, 2685-2692.
- Chen, L., Juszczynski, P., Takeyama, K., Aguiar, R.C., and Shipp, M.A. (2006). Protein tyrosine phosphatase receptor-type O truncated (PTPROt) regulates SYK phosphorylation, proximal B-cell-receptor signaling, and cellular proliferation. *Blood* 108, 3428-3433.
- Chen, L., Monti, S., Juszczynski, P., Daley, J., Chen, W., Witzig, T.E., Habermann, T.M., Kutok, J.L., and Shipp, M.A. (2008b). SYK-dependent tonic B-cell receptor signaling is a rational treatment target in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* 111, 2230-2237.

- Chen, L., Monti, S., Juszczynski, P., Ouyang, J., Chapuy, B., Neuberg, D., Doench, J.G., Bogusz, A.M., Habermann, T.M., Dogan, A., et al. (2013). SYK inhibition modulates distinct PI3K/AKT- dependent survival pathways and cholesterol biosynthesis in diffuse large B cell lymphomas. *Cancer cell* 23, 826-838.
- Cheng, A.M., Rowley, B., Pao, W., Hayday, A., Bolen, J.B., and Pawson, T. (1995). Syk tyrosine kinase required for mouse viability and B-cell development. *Nature* 378, 303-306.
- Cheng, S., Coffey, G., Zhang, X.H., Shaknovich, R., Song, Z., Lu, P., Pandey, A., Melnick, A.M., Sinha, U., and Wang, Y.L. (2011). SYK inhibition and response prediction in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* 118, 6342-6352.
- Cheung, M., Chaboissier, M.C., Mynett, A., Hirst, E., Schedl, A., and Briscoe, J. (2005). The transcriptional control of trunk neural crest induction, survival, and delamination. *Developmental cell* 8, 179-192.
- Clark, E.S., and Weaver, A.M. (2008). A new role for cortactin in invadopodia: regulation of protease secretion. *Eur J Cell Biol* 87, 581-590.
- Clark, E.S., Whigham, A.S., Yarbrough, W.G., and Weaver, A.M. (2007). Cortactin is an essential regulator of matrix metalloproteinase secretion and extracellular matrix degradation in invadopodia. *Cancer research* 67, 4227-4235.
- Clark, W.H., Jr., Elder, D.E., Guerry, D.t., Epstein, M.N., Greene, M.H., and Van Horn, M. (1984). A study of tumor progression: the precursor lesions of superficial spreading and nodular melanoma. *Hum Pathol* 15, 1147-1165.
- Clements, J.M., Newham, P., Shepherd, M., Gilbert, R., Dudgeon, T.J., Needham, L.A., Edwards, R.M., Berry, L., Brass, A., and Humphries, M.J. (1994). Identification of a key integrin-binding sequence in VCAM-1 homologous to the LDV active site in fibronectin. *Journal of cell science* 107 (Pt 8), 2127-2135.
- Cohen, C., Zavala-Pompa, A., Sequeira, J.H., Shoji, M., Sexton, D.G., Cotsonis, G., Cerimele, F., Govindarajan, B., Macaron, N., and Arbiser, J.L. (2002). Mitogen-activated protein kinase activation is an early event in melanoma progression. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 8, 3728-3733.
- Cohen, D.J., Nelson, W.J., and Maharbiz, M.M. (2014). Galvanotactic control of collective cell migration in epithelial monolayers. *Nat Mater* 13, 409-417.
- Collin, O., Na, S., Chowdhury, F., Hong, M., Shin, M.E., Wang, F., and Wang, N. (2008). Self-organized podosomes are dynamic mechanosensors. *Curr Biol* 18, 1288-1294.
- Colognato, H., and Yurchenco, P.D. (2000). Form and function: the laminin family of heterotrimers. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* 218, 213-234.
- Colombelli, J., Besser, A., Kress, H., Reynaud, E.G., Girard, P., Caussinus, E., Haselmann, U., Small, J.V., Schwarz, U.S., and Stelzer, E.H. (2009). Mechanosensing in actin stress fibers revealed by a close correlation between force and protein localization. *Journal of cell science* 122, 1665-1679.
- Colucci, F., Schweighoffer, E., Tomasello, E., Turner, M., Ortaldo, J.R., Vivier, E., Tybulewicz, V.L., and Di Santo, J.P. (2002). Natural cytotoxicity uncoupled from the Syk and ZAP-70 intracellular kinases. *Nat Immunol* 3, 288-294.
- Coopman, P.J., Do, M.T., Barth, M., Bowden, E.T., Hayes, A.J., Basyuk, E., Blancato, J.K., Vezza, P.R., McLeskey, S.W., Mangeat, P.H., et al. (2000). The Syk tyrosine kinase suppresses malignant growth of human breast cancer cells. *Nature* 406, 742-747.
- Couture, C., Deckert, M., Williams, S., Russo, F.O., Altman, A., and Mustelin, T. (1996). Identification of the site in the Syk protein tyrosine kinase that binds the SH2 domain of Lck. *The Journal of biological chemistry* 271, 24294-24299.
- Cornell, R.A., and Eisen, J.S. (2005). Notch in the pathway: the roles of Notch signaling in neural crest development. *Semin Cell Dev Biol* 16, 663-672.
- Cortese, B., Palama, I.E., D'Amone, S., and Gigli, G. (2014). Influence of electrotaxis on cell behaviour. *Integr Biol (Camb)* 6, 817-830.
- Costello, P.S., Turner, M., Walters, A.E., Cunningham, C.N., Bauer, P.H., Downward, J., and Tybulewicz, V.L. (1996). Critical role for the tyrosine kinase Syk in signalling through the high affinity IgE receptor of mast cells. *Oncogene* 13, 2595-2605.
- Crespo, M., Bosch, F., Villamor, N., Bellosillo, B., Colomer, D., Rozman, M., Marce, S., Lopez-Guillermo, A., Campo, E., and Montserrat, E. (2003). ZAP-70 expression as a surrogate for immunoglobulin-variable-region mutations in chronic lymphocytic leukemia. *The New England journal of medicine* 348, 1764-1775.
- Curtin, J.A., Busam, K., Pinkel, D., and Bastian, B.C. (2006). Somatic activation of KIT in distinct subtypes of melanoma. *J Clin Oncol* 24, 4340-4346.
- Curtin, J.A., Fridlyand, J., Kageshita, T., Patel, H.N., Busam, K.J., Kutzner, H., Cho, K.H., Aiba, S., Brocker, E.B., LeBoit, P.E., et al. (2005). Distinct sets of genetic alterations in melanoma. *The New England journal of medicine* 353, 2135-2147.

- Damiano, J.S. (2002). Integrins as novel drug targets for overcoming innate drug resistance. *Curr Cancer Drug Targets* 2, 37-43.
- Dankort, D., Curley, D.P., Cartlidge, R.A., Nelson, B., Karnezis, A.N., Damsky, W.E., Jr., You, M.J., DePinho, R.A., McMahon, M., and Bosenberg, M. (2009). Braf(V600E) cooperates with Pten loss to induce metastatic melanoma. *Nature genetics* 41, 544-552.
- Datta, S.R., Brunet, A., and Greenberg, M.E. (1999). Cellular survival: a play in three Akts. *Genes & development* 13, 2905-2927.
- Daub, J.T., and Merks, R.M. (2013). A cell-based model of extracellular-matrix-guided endothelial cell migration during angiogenesis. *Bull Math Biol* 75, 1377-1399.
- Dave, N., Guaita-Esteruelas, S., Gutarra, S., Frias, A., Beltran, M., Peiro, S., and de Herreros, A.G. (2011). Functional cooperation between Snail1 and twist in the regulation of ZEB1 expression during epithelial to mesenchymal transition. *The Journal of biological chemistry* 286, 12024-12032.
- Davies, H., Bignell, G.R., Cox, C., Stephens, P., Edkins, S., Clegg, S., Teague, J., Woffendin, H., Garnett, M.J., Bottomley, W., et al. (2002). Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* 417, 949-954.
- Davis, R.E., Ngo, V.N., Lenz, G., Tolar, P., Young, R.M., Romesser, P.B., Kohlhammer, H., Lamy, L., Zhao, H., Yang, Y., et al. (2010). Chronic active B-cell-receptor signalling in diffuse large B-cell lymphoma. *Nature* 463, 88-92.
- De Craene, B., and Berx, G. (2013). Regulatory networks defining EMT during cancer initiation and progression. *Nature reviews Cancer* 13, 97-110.
- de Fougères, A.R., Sprague, A.G., Nickerson-Nutter, C.L., Chi-Rosso, G., Rennert, P.D., Gardner, H., Gotwals, P.J., Lobb, R.R., and Kotliansky, V.E. (2000). Regulation of inflammation by collagen-binding integrins alpha1beta1 and alpha2beta1 in models of hypersensitivity and arthritis. *The Journal of clinical investigation* 105, 721-729.
- de Fougères, A.R., and Springer, T.A. (1992). Intercellular adhesion molecule 3, a third adhesion counter-receptor for lymphocyte function-associated molecule 1 on resting lymphocytes. *The Journal of experimental medicine* 175, 185-190.
- De Franceschi, N., Hamidi, H., Alanko, J., Sahgal, P., and Ivaska, J. (2015). Integrin traffic - the update. *Journal of cell science* 128, 839-852.
- Deckert, M., Elly, C., Altman, A., and Liu, Y.C. (1998a). Coordinated regulation of the tyrosine phosphorylation of Cbl by Fyn and Syk tyrosine kinases. *The Journal of biological chemistry* 273, 8867-8874.
- Deckert, M., Tartare-Deckert, S., Couture, C., Mustelin, T., and Altman, A. (1996). Functional and physical interactions of Syk family kinases with the Vav proto-oncogene product. *Immunity* 5, 591-604.
- Deckert, M., Tartare-Deckert, S., Hernandez, J., Rottapel, R., and Altman, A. (1998). Adaptor function for the Syk kinases-interacting protein 3BP2 in IL-2 gene activation. *Immunity* 9, 595-605.
- Dee, K.C., Anderson, T.T., and Bizios, R. (1999). Osteoblast population migration characteristics on substrates modified with immobilized adhesive peptides. *Biomaterials* 20, 221-227.
- Delmas, V., Martinozzi, S., Bourgeois, Y., Holzenberger, M., and Larue, L. (2003). Cre-mediated recombination in the skin melanocyte lineage. *Genesis* 36, 73-80.
- Denecker, G., Vandamme, N., Akay, O., Koludrovic, D., Taminau, J., Lemeire, K., Gheldof, A., De Craene, B., Van Gele, M., Brochez, L., et al. (2014). Identification of a ZEB2-MITF-ZEB1 transcriptional network that controls melanogenesis and melanoma progression. *Cell Death Differ* 21, 1250-1261.
- Deng, W., Gopal, Y.N., Scott, A., Chen, G., Woodman, S.E., and Davies, M.A. (2012). Role and therapeutic potential of PI3K-mTOR signaling in de novo resistance to BRAF inhibition. *Pigment cell & melanoma research* 25, 248-258.
- Derynck, R., and Zhang, Y.E. (2003). Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling. *Nature* 425, 577-584.
- Desgrosellier, J.S., Barnes, L.A., Shields, D.J., Huang, M., Lau, S.K., Prevost, N., Tarin, D., Shattil, S.J., and Cheresch, D.A. (2009). An integrin alpha(v)beta(3)-c-Src oncogenic unit promotes anchorage-independence and tumor progression. *Nat Med* 15, 1163-1169.
- Desgrosellier, J.S., and Cheresch, D.A. (2010). Integrins in cancer: biological implications and therapeutic opportunities. *Nature reviews Cancer* 10, 9-22.
- Desgrosellier, J.S., Lesperance, J., Seguin, L., Gozo, M., Kato, S., Franovic, A., Yebra, M., Shattil, S.J., and Cheresch, D.A. (2014). Integrin alphavbeta3 drives slug activation and stemness in the pregnant and neoplastic mammary gland. *Developmental cell* 30, 295-308.

- Destaing, O., Planus, E., Bouvard, D., Oddou, C., Badowski, C., Bossy, V., Raducanu, A., Fourcade, B., Albiges-Rizo, C., and Block, M.R. (2010). beta1A integrin is a master regulator of invadosome organization and function. *Molecular biology of the cell* 21, 4108-4119.
- Dhomen, N., Reis-Filho, J.S., da Rocha Dias, S., Hayward, R., Savage, K., Delmas, V., Larue, L., Pritchard, C., and Marais, R. (2009). Oncogenic Braf induces melanocyte senescence and melanoma in mice. *Cancer cell* 15, 294-303.
- Dickeson, S.K., Mathis, N.L., Rahman, M., Bergelson, J.M., and Santoro, S.A. (1999). Determinants of ligand binding specificity of the alpha(1)beta(1) and alpha(2)beta(1) integrins. *The Journal of biological chemistry* 274, 32182-32191.
- Dickinson, R.B., Guido, S., and Tranquillo, R.T. (1994). Biased cell migration of fibroblasts exhibiting contact guidance in oriented collagen gels. *Ann Biomed Eng* 22, 342-356.
- Dierks, C., Adrian, F., Fisch, P., Ma, H., Maurer, H., Herchenbach, D., Forster, C.U., Sprissler, C., Liu, G., Rottmann, S., et al. (2010). The ITK-SYK fusion oncogene induces a T-cell lymphoproliferative disease in mice mimicking human disease. *Cancer research* 70, 6193-6204.
- Ding, J., Takano, T., Gao, S., Han, W., Noda, C., Yanagi, S., and Yamamura, H. (2000). Syk is required for the activation of Akt survival pathway in B cells exposed to oxidative stress. *The Journal of biological chemistry* 275, 30873-30877.
- Dissanayake, S.K., Wade, M., Johnson, C.E., O'Connell, M.P., Leotlela, P.D., French, A.D., Shah, K.V., Hewitt, K.J., Rosenthal, D.T., Indig, F.E., et al. (2007). The Wnt5A/protein kinase C pathway mediates motility in melanoma cells via the inhibition of metastasis suppressors and initiation of an epithelial to mesenchymal transition. *The Journal of biological chemistry* 282, 17259-17271.
- Doehn, U., Hauge, C., Frank, S.R., Jensen, C.J., Duda, K., Nielsen, J.V., Cohen, M.S., Johansen, J.V., Winther, B.R., Lund, L.R., et al. (2009). RSK is a principal effector of the RAS-ERK pathway for eliciting a coordinate promotile/invasive gene program and phenotype in epithelial cells. *Molecular cell* 35, 511-522.
- Dona, E., Barry, J.D., Valentin, G., Quirin, C., Khmelinskii, A., Kunze, A., Durdu, S., Newton, L.R., Fernandez-Minan, A., Huber, W., et al. (2013). Directional tissue migration through a self-generated chemokine gradient. *Nature* 503, 285-289.
- Donaldson, J.G., and Jackson, C.L. (2011). ARF family G proteins and their regulators: roles in membrane transport, development and disease. *Nature reviews Molecular cell biology* 12, 362-375.
- Dong, C., Wu, Y., Wang, Y., Wang, C., Kang, T., Rychahou, P.G., Chi, Y.I., Evers, B.M., and Zhou, B.P. (2013). Interaction with Suv39H1 is critical for Snail-mediated E-cadherin repression in breast cancer. *Oncogene* 32, 1351-1362.
- Dong, C., Wu, Y., Yao, J., Wang, Y., Yu, Y., Rychahou, P.G., Evers, B.M., and Zhou, B.P. (2012). G9a interacts with Snail and is critical for Snail-mediated E-cadherin repression in human breast cancer. *The Journal of clinical investigation* 122, 1469-1486.
- Doyle, A.D., Wang, F.W., Matsumoto, K., and Yamada, K.M. (2009). One-dimensional topography underlies three-dimensional fibrillar cell migration. *The Journal of cell biology* 184, 481-490.
- Dozynkiewicz, M.A., Jamieson, N.B., Macpherson, I., Grindlay, J., van den Berghe, P.V., von Thun, A., Morton, J.P., Gourley, C., Timpson, P., Nixon, C., et al. (2012). Rab25 and CLIC3 collaborate to promote integrin recycling from late endosomes/lysosomes and drive cancer progression. *Developmental cell* 22, 131-145.
- Dror, S., Sander, L., Schwartz, H., Sheinboim, D., Barzilai, A., Dishon, Y., Apcher, S., Golan, T., Greenberger, S., Barshack, I., et al. (2016). Melanoma miRNA trafficking controls tumour primary niche formation. *Nat Cell Biol* 18, 1006-1017.
- Du, C., Zhang, C., Hassan, S., Biswas, M.H., and Balaji, K.C. (2010). Protein kinase D1 suppresses epithelial-to-mesenchymal transition through phosphorylation of snail. *Cancer research* 70, 7810-7819.
- Dustin, L.B., Plas, D.R., Wong, J., Hu, Y.T., Soto, C., Chan, A.C., and Thomas, M.L. (1999). Expression of dominant-negative src-homology domain 2-containing protein tyrosine phosphatase-1 results in increased Syk tyrosine kinase activity and B cell activation. *Journal of immunology* 162, 2717-2724.
- Dustin, M.L., and Springer, T.A. (1988). Lymphocyte function-associated antigen-1 (LFA-1) interaction with intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) is one of at least three mechanisms for lymphocyte adhesion to cultured endothelial cells. *The Journal of cell biology* 107, 321-331.
- Eble, J.A., and de Rezende, F.F. (2014). Redox-relevant aspects of the extracellular matrix and its cellular contacts via integrins. *Antioxid Redox Signal* 20, 1977-1993.
- Egeblad, M., Nakasone, E.S., and Werb, Z. (2010). Tumors as organs: complex tissues that interface with the entire organism. *Developmental cell* 18, 884-901.

- Eggermont, A.M., Chiarion-Sileni, V., Grob, J.J., Dummer, R., Wolchok, J.D., Schmidt, H., Hamid, O., Robert, C., Ascierto, P.A., Richards, J.M., et al. (2016). Prolonged Survival in Stage III Melanoma with Ipilimumab Adjuvant Therapy. *The New England journal of medicine*.
- Eichhoff, O.M., Weeraratna, A., Zipser, M.C., Denat, L., Widmer, D.S., Xu, M., Kriegl, L., Kirchner, T., Larue, L., Dummer, R., et al. (2011). Differential LEF1 and TCF4 expression is involved in melanoma cell phenotype switching. *Pigment cell & melanoma research* 24, 631-642.
- Eijkelenboom, A., and Burgering, B.M. (2013). FOXOs: signalling integrators for homeostasis maintenance. *Nature reviews Molecular cell biology* 14, 83-97.
- Eke, I., Deuse, Y., Hehlgans, S., Gurtner, K., Krause, M., Baumann, M., Shevchenko, A., Sandfort, V., and Cordes, N. (2012). beta(1)Integrin/FAK/cortactin signaling is essential for human head and neck cancer resistance to radiotherapy. *The Journal of clinical investigation* 122, 1529-1540.
- Ekholm, E., Hankenson, K.D., Uusitalo, H., Hiltunen, A., Gardner, H., Heino, J., and Penttinen, R. (2002). Diminished callus size and cartilage synthesis in alpha 1 beta 1 integrin-deficient mice during bone fracture healing. *Am J Pathol* 160, 1779-1785.
- el-Deiry, W.S., Tokino, T., Velculescu, V.E., Levy, D.B., Parsons, R., Trent, J.M., Lin, D., Mercer, W.E., Kinzler, K.W., and Vogelstein, B. (1993). WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell* 75, 817-825.
- El-Hillal, O., Kurosaki, T., Yamamura, H., Kinet, J.P., and Scharenberg, A.M. (1997). syk kinase activation by a src kinase-initiated activation loop phosphorylation chain reaction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 1919-1924.
- El Ghissassi, F., Baan, R., Straif, K., Grosse, Y., Secretan, B., Bouvard, V., Benbrahim-Tallaa, L., Guha, N., Freeman, C., Galichet, L., et al. (2009). A review of human carcinogens--part D: radiation. *Lancet Oncol* 10, 751-752.
- Elder, D.E. (2006). Pathology of melanoma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 12, 2308s-2311s.
- Elez, E., Kocakova, I., Hohler, T., Martens, U.M., Bokemeyer, C., Van Cutsem, E., Melichar, B., Smakal, M., Csozsi, T., Topuzov, E., et al. (2015). Abituzumab combined with cetuximab plus irinotecan versus cetuximab plus irinotecan alone for patients with KRAS wild-type metastatic colorectal cancer: the randomised phase I/II POSEIDON trial. *Ann Oncol* 26, 132-140.
- Elias, P.M. (2005). Stratum corneum defensive functions: an integrated view. *The Journal of investigative dermatology* 125, 183-200.
- Elwood, J.M., Whitehead, S.M., Davison, J., Stewart, M., and Galt, M. (1990). Malignant melanoma in England: risks associated with naevi, freckles, social class, hair colour, and sunburn. *Int J Epidemiol* 19, 801-810.
- Erle, D.J., Briskin, M.J., Butcher, E.C., Garcia-Pardo, A., Lazarovits, A.I., and Tidswell, M. (1994). Expression and function of the MAdCAM-1 receptor, integrin alpha 4 beta 7, on human leukocytes. *Journal of immunology* 153, 517-528.
- Esposito, M., and Kang, Y. (2014). Targeting tumor-stromal interactions in bone metastasis. *Pharmacol Ther* 141, 222-233.
- Etienne-Manneville, S., and Hall, A. (2002). Rho GTPases in cell biology. *Nature* 420, 629-635.
- Ezratty, E.J., Partridge, M.A., and Gundersen, G.G. (2005). Microtubule-induced focal adhesion disassembly is mediated by dynamin and focal adhesion kinase. *Nat Cell Biol* 7, 581-590.
- Fagotto, F., Rohani, N., Touret, A.S., and Li, R. (2013). A molecular base for cell sorting at embryonic boundaries: contact inhibition of cadherin adhesion by ephrin/ Eph-dependent contractility. *Developmental cell* 27, 72-87.
- Fallah-Arani, F., Schweighoffer, E., Vanes, L., and Tybulewicz, V.L. (2008). Redundant role for Zap70 in B cell development and activation. *Eur J Immunol* 38, 1721-1733.
- Farge, E. (2003). Mechanical induction of Twist in the Drosophila foregut/stomodaeal primordium. *Curr Biol* 13, 1365-1377.
- Feki, A., and Irminger-Finger, I. (2004). Mutational spectrum of p53 mutations in primary breast and ovarian tumors. *Crit Rev Oncol Hematol* 52, 103-116.
- Feldman, A.L., Sun, D.X., Law, M.E., Novak, A.J., Attygalle, A.D., Thorland, E.C., Fink, S.R., Vrana, J.A., Caron, B.L., Morice, W.G., et al. (2008). Overexpression of Syk tyrosine kinase in peripheral T-cell lymphomas. *Leukemia* 22, 1139-1143.
- Fendrich, V., Waldmann, J., Esni, F., Ramaswamy, A., Mullendore, M., Buchholz, M., Maitra, A., and Feldmann, G. (2007). Snail and Sonic Hedgehog activation in neuroendocrine tumors of the ileum. *Endocr Relat Cancer* 14, 865-874.
- Fenouille, N., Puissant, A., Tichet, M., Zimniak, G., Abbe, P., Mallavialle, A., Rocchi, S., Ortonne, J.P., Deckert, M., Ballotti, R., et al. (2011). SPARC functions as an anti-stress factor by inactivating p53 through Akt-mediated MDM2 phosphorylation to promote melanoma cell survival. *Oncogene* 30, 4887-4900.

- Fenouille, N., Tichet, M., Dufies, M., Pottier, A., Mogha, A., Soo, J.K., Rocchi, S., Mallavialle, A., Galibert, M.D., Khammari, A., et al. (2012). The epithelial-mesenchymal transition (EMT) regulatory factor SLUG (SNAI2) is a downstream target of SPARC and AKT in promoting melanoma cell invasion. *PLoS One* 7, e40378.
- Fernandez, J.A., Keshvara, L.M., Peters, J.D., Furlong, M.T., Harrison, M.L., and Geahlen, R.L. (1999). Phosphorylation- and activation-independent association of the tyrosine kinase Syk and the tyrosine kinase substrates Cbl and Vav with tubulin in B-cells. *The Journal of biological chemistry* 274, 1401-1406.
- Finger, E.C., and Giaccia, A.J. (2010). Hypoxia, inflammation, and the tumor microenvironment in metastatic disease. *Cancer Metastasis Rev* 29, 285-293.
- Fiorucci, S., Mencarelli, A., Palazzetti, B., Sprague, A.G., Distrutti, E., Morelli, A., Novobrantseva, T.I., Cirino, G., Kotliansky, V.E., and de Fougères, A.R. (2002). Importance of innate immunity and collagen binding integrin alpha1beta1 in TNBS-induced colitis. *Immunity* 17, 769-780.
- Fitzpatrick, T.B. (1988). The validity and practicality of sun-reactive skin types I through VI. *Archives of dermatology* 124, 869-871.
- Flaherty, K.T., Lorusso, P.M., Demichele, A., Abramson, V.G., Courtney, R., Randolph, S.S., Shaik, M.N., Wilner, K.D., O'Dwyer, P.J., and Schwartz, G.K. (2012). Phase I, dose-escalation trial of the oral cyclin-dependent kinase 4/6 inhibitor PD 0332991, administered using a 21-day schedule in patients with advanced cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 18, 568-576.
- Flores, J.F., Walker, G.J., Glendening, J.M., Haluska, F.G., Castresana, J.S., Rubio, M.P., Pastorfide, G.C., Boyer, L.A., Kao, W.H., Bulyk, M.L., et al. (1996). Loss of the p16INK4a and p15INK4b genes, as well as neighboring 9p21 markers, in sporadic melanoma. *Cancer research* 56, 5023-5032.
- Fluck, M., Zurcher, G., Andres, A.C., and Ziemiecki, A. (1995). Molecular characterization of the murine syk protein tyrosine kinase cDNA, transcripts and protein. *Biochemical and biophysical research communications* 213, 273-281.
- Fotheringham, J.A., Coalson, N.E., and Raab-Traub, N. (2012). Epstein-Barr virus latent membrane protein-2A induces ITAM/Syk- and Akt-dependent epithelial migration through alphav-integrin membrane translocation. *J Virol* 86, 10308-10320.
- Foucault, I., Le Bras, S., Charvet, C., Moon, C., Altman, A., and Deckert, M. (2005). The adaptor protein 3BP2 associates with VAV guanine nucleotide exchange factors to regulate NFAT activation by the B-cell antigen receptor. *Blood* 105, 1106-1113.
- Fouchard, J., Mitrossilis, D., and Asnacios, A. (2011). Acto-myosin based response to stiffness and rigidity sensing. *Cell Adh Migr* 5, 16-19.
- Friedberg, J.W., Sharman, J., Sweetenham, J., Johnston, P.B., Vose, J.M., Lacasce, A., Schaefer-Cuttillo, J., De Vos, S., Sinha, R., Leonard, J.P., et al. (2010). Inhibition of Syk with fostamatinib disodium has significant clinical activity in non-Hodgkin lymphoma and chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 115, 2578-2585.
- Friedl, P., and Gilmour, D. (2009). Collective cell migration in morphogenesis, regeneration and cancer. *Nature reviews Molecular cell biology* 10, 445-457.
- Friedl, P., Sahai, E., Weiss, S., and Yamada, K.M. (2012). New dimensions in cell migration. *Nature reviews Molecular cell biology* 13, 743-747.
- Friedl, P., and Weigelin, B. (2008). Interstitial leukocyte migration and immune function. *Nat Immunol* 9, 960-969.
- Friedl, P., and Wolf, K. (2010). Plasticity of cell migration: a multiscale tuning model. *The Journal of cell biology* 188, 11-19.
- Fruman, D.A., Snapper, S.B., Yballe, C.M., Davidson, L., Yu, J.Y., Alt, F.W., and Cantley, L.C. (1999). Impaired B cell development and proliferation in absence of phosphoinositide 3-kinase p85alpha. *Science* 283, 393-397.
- Fu, C., Turck, C.W., Kurosaki, T., and Chan, A.C. (1998). BLNK: a central linker protein in B cell activation. *Immunity* 9, 93-103.
- Fujiwara, H., Ferreira, M., Donati, G., Marciano, D.K., Linton, J.M., Sato, Y., Hartner, A., Sekiguchi, K., Reichardt, L.F., and Watt, F.M. (2011). The basement membrane of hair follicle stem cells is a muscle cell niche. *Cell* 144, 577-589.
- Fuller, G.L., Williams, J.A., Tomlinson, M.G., Eble, J.A., Hanna, S.L., Pohlmann, S., Suzuki-Inoue, K., Ozaki, Y., Watson, S.P., and Pearce, A.C. (2007). The C-type lectin receptors CLEC-2 and Dectin-1, but not DC-SIGN, signal via a novel YXXL-dependent signaling cascade. *The Journal of biological chemistry* 282, 12397-12409.
- Funasaka, K., Ito, S., Hasegawa, H., Goldberg, G.S., Hirooka, Y., Goto, H., Hamaguchi, M., and Senga, T. (2010). Cas utilizes Nck2 to activate Cdc42 and regulate cell polarization during cell migration in response to wound healing. *FEBS J* 277, 3502-3513.

- Gabbiani, G., Ryan, G.B., and Majne, G. (1971). Presence of modified fibroblasts in granulation tissue and their possible role in wound contraction. *Experientia* 27, 549-550.
- Gagen, D., Faralli, J.A., Filla, M.S., and Peters, D.M. (2014). The role of integrins in the trabecular meshwork. *J Ocul Pharmacol Ther* 30, 110-120.
- Gaggioli, C., Deckert, M., Robert, G., Abbe, P., Batoz, M., Ehrenguber, M.U., Ortonne, J.P., Ballotti, R., and Tartare-Deckert, S. (2005). HGF induces fibronectin matrix synthesis in melanoma cells through MAP kinase-dependent signaling pathway and induction of Egr-1. *Oncogene* 24, 1423-1433.
- Gallagher, P.G., Bao, Y., Prorock, A., Zigrino, P., Nischt, R., Politi, V., Mauch, C., Dragulev, B., and Fox, J.W. (2005). Gene expression profiling reveals cross-talk between melanoma and fibroblasts: implications for host-tumor interactions in metastasis. *Cancer research* 65, 4134-4146.
- Gallant, N.D., Michael, K.E., and Garcia, A.J. (2005). Cell adhesion strengthening: contributions of adhesive area, integrin binding, and focal adhesion assembly. *Molecular biology of the cell* 16, 4329-4340.
- Gao, J., Aksoy, B.A., Dogrusoz, U., Dresdner, G., Gross, B., Sumer, S.O., Sun, Y., Jacobsen, A., Sinha, R., Larsson, E., et al. (2013). Integrative analysis of complex cancer genomics and clinical profiles using the cBioPortal. *Science signaling* 6, pl1.
- Gao, J., Zoller, K.E., Ginsberg, M.H., Brugge, J.S., and Shattil, S.J. (1997). Regulation of the pp72syk protein tyrosine kinase by platelet integrin alpha IIb beta 3. *The EMBO journal* 16, 6414-6425.
- Garbe, C., Peris, K., Hauschild, A., Saiag, P., Middleton, M., Spatz, A., Grob, J.J., Malvehy, J., Newton-Bishop, J., Stratigos, A., et al. (2010). Diagnosis and treatment of melanoma: European consensus-based interdisciplinary guideline. *Eur J Cancer* 46, 270-283.
- Garcia-Castro, M.I., Marcelle, C., and Bronner-Fraser, M. (2002). Ectodermal Wnt function as a neural crest inducer. *Science* 297, 848-851.
- Garcia-Silva, S., and Peinado, H. (2016). Melanosomes foster a tumour niche by activating CAFs. *Nat Cell Biol* 18, 911-913.
- Garcia, G.L., Rericha, E.C., Heger, C.D., Goldsmith, P.K., and Parent, C.A. (2009). The group migration of Dictyostelium cells is regulated by extracellular chemoattractant degradation. *Molecular biology of the cell* 20, 3295-3304.
- Gardner, H.A. (1999). Integrin signaling in fibrosis and scleroderma. *Curr Rheumatol Rep* 1, 28-33.
- Garibyan, L., and Fisher, D.E. (2010). How sunlight causes melanoma. *Curr Oncol Rep* 12, 319-326.
- Garmy-Susini, B., Avraamides, C.J., Desgrosellier, J.S., Schmid, M.C., Foubert, P., Ellies, L.G., Lowy, A.M., Blair, S.L., Vandenberg, S.R., Datnow, B., et al. (2013). PI3Kalpha activates integrin alpha4beta1 to establish a metastatic niche in lymph nodes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, 9042-9047.
- Gateva, G., Tojkander, S., Koho, S., Carpen, O., and Lappalainen, P. (2014). Palladin promotes assembly of non-contractile dorsal stress fibers through VASP recruitment. *Journal of cell science* 127, 1887-1898.
- Gawden-Bone, C., Zhou, Z., King, E., Prescott, A., Watts, C., and Lucocq, J. (2010). Dendritic cell podosomes are protrusive and invade the extracellular matrix using metalloproteinase MMP-14. *Journal of cell science* 123, 1427-1437.
- Geahlen, R.L. (2009). Syk and pTyr'd: Signaling through the B cell antigen receptor. *Biochimica et biophysica acta* 1793, 1115-1127.
- Geiger, B., Spatz, J.P., and Bershadsky, A.D. (2009). Environmental sensing through focal adhesions. *Nature reviews Molecular cell biology* 10, 21-33.
- Gembarska, A., Luciani, F., Fedele, C., Russell, E.A., Dewaele, M., Villar, S., Zwolinska, A., Haupt, S., de Lange, J., Yip, D., et al. (2012). MDM4 is a key therapeutic target in cutaneous melanoma. *Nat Med* 18, 1239-1247.
- Gibney, G.T., and Smalley, K.S. (2013). An unholy alliance: cooperation between BRAF and NF1 in melanoma development and BRAF inhibitor resistance. *Cancer discovery* 3, 260-263.
- Gilcrease, M.Z. (2007). Integrin signaling in epithelial cells. *Cancer Lett* 247, 1-25.
- Gimona, M., Buccione, R., Courtneidge, S.A., and Linder, S. (2008). Assembly and biological role of podosomes and invadopodia. *Current opinion in cell biology* 20, 235-241.
- Girotti, M.R., Pedersen, M., Sanchez-Laorden, B., Viros, A., Turajlic, S., Niculescu-Duvaz, D., Zambon, A., Sinclair, J., Hayes, A., Gore, M., et al. (2013). Inhibiting EGF receptor or SRC family kinase signaling overcomes BRAF inhibitor resistance in melanoma. *Cancer discovery* 3, 158-167.
- Giuliano, M., Herrera, S., Christiny, P., Shaw, C., Creighton, C.J., Mitchell, T., Bhat, R., Zhang, X., Mao, S., Dobroletcki, L.E., et al. (2015). Circulating and disseminated tumor cells from breast cancer patient-derived xenograft-bearing mice as a novel model to study metastasis. *Breast Cancer Res* 17, 3.

- Glassford, J., Holman, M., Banerji, L., Clayton, E., Klaus, G.G., Turner, M., and Lam, E.W. (2001). Vav is required for cyclin D2 induction and proliferation of mouse B lymphocytes activated via the antigen Receptor. *The Journal of biological chemistry* 276, 41040-41048.
- Gobessi, S., Laurenti, L., Longo, P.G., Carsetti, L., Berno, V., Sica, S., Leone, G., and Efremov, D.G. (2009). Inhibition of constitutive and BCR-induced Syk activation downregulates Mcl-1 and induces apoptosis in chronic lymphocytic leukemia B cells. *Leukemia* 23, 686-697.
- Godde, N.J., Galea, R.C., Esum, I.A., and Humbert, P.O. (2010). Cell polarity in motion: redefining mammary tissue organization through EMT and cell polarity transitions. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 15, 149-168.
- Goel, H.L., Gritsko, T., Pursell, B., Chang, C., Shultz, L.D., Greiner, D.L., Norum, J.H., Toftgard, R., Shaw, L.M., and Mercurio, A.M. (2014). Regulated splicing of the alpha6 integrin cytoplasmic domain determines the fate of breast cancer stem cells. *Cell reports* 7, 747-761.
- Goel, H.L., Pursell, B., Chang, C., Shaw, L.M., Mao, J., Simin, K., Kumar, P., Vander Kooi, C.W., Shultz, L.D., Greiner, D.L., et al. (2013). GLI1 regulates a novel neuropilin-2/alpha6beta1 integrin based autocrine pathway that contributes to breast cancer initiation. *EMBO Mol Med* 5, 488-508.
- Goel, V.K., Lazar, A.J., Warneke, C.L., Redston, M.S., and Haluska, F.G. (2006). Examination of mutations in BRAF, NRAS, and PTEN in primary cutaneous melanoma. *The Journal of investigative dermatology* 126, 154-160.
- Goldstein, A.M., Chan, M., Harland, M., Gillanders, E.M., Hayward, N.K., Avril, M.F., Azizi, E., Bianchi-Scarra, G., Bishop, D.T., Bressac-de Paillerets, B., et al. (2006). High-risk melanoma susceptibility genes and pancreatic cancer, neural system tumors, and uveal melanoma across GenoMEL. *Cancer research* 66, 9818-9828.
- Goldstein, A.M., Struewing, J.P., Chidambaram, A., Fraser, M.C., and Tucker, M.A. (2000). Genotype-phenotype relationships in U.S. melanoma-prone families with CDKN2A and CDK4 mutations. *J Natl Cancer Inst* 92, 1006-1010.
- Goncalves, V., Matos, P., and Jordan, P. (2009). Antagonistic SR proteins regulate alternative splicing of tumor-related Rac1b downstream of the PI3-kinase and Wnt pathways. *Human molecular genetics* 18, 3696-3707.
- Goodman, P.A., Wood, C.M., Vassilev, A., Mao, C., and Uckun, F.M. (2001). Spleen tyrosine kinase (Syk) deficiency in childhood pro-B cell acute lymphoblastic leukemia. *Oncogene* 20, 3969-3978.
- Gopal, Y.N., Deng, W., Woodman, S.E., Komurov, K., Ram, P., Smith, P.D., and Davies, M.A. (2010). Basal and treatment-induced activation of AKT mediates resistance to cell death by AZD6244 (ARRY-142886) in Braf-mutant human cutaneous melanoma cells. *Cancer research* 70, 8736-8747.
- Gordon, K.J., Kirkbride, K.C., How, T., and Blobel, G.C. (2009). Bone morphogenetic proteins induce pancreatic cancer cell invasiveness through a Smad1-dependent mechanism that involves matrix metalloproteinase-2. *Carcinogenesis* 30, 238-248.
- Gottesman, M.M., Fojo, T., and Bates, S.E. (2002). Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters. *Nature reviews Cancer* 2, 48-58.
- Goulas, S., Conder, R., and Knoblich, J.A. (2012). The Par complex and integrins direct asymmetric cell division in adult intestinal stem cells. *Cell Stem Cell* 11, 529-540.
- Gradler, U., Schwarz, D., Dresing, V., Musil, D., Bomke, J., Frech, M., Greiner, H., Jakel, S., Rysiok, T., Muller-Pompalla, D., et al. (2013). Structural and biophysical characterization of the Syk activation switch. *J Mol Biol* 425, 309-333.
- Graham, T.R., Zhau, H.E., Odero-Marah, V.A., Osunkoya, A.O., Kimbro, K.S., Tighiouart, M., Liu, T., Simons, J.W., and O'Regan, R.M. (2008). Insulin-like growth factor-I-dependent up-regulation of ZEB1 drives epithelial-to-mesenchymal transition in human prostate cancer cells. *Cancer research* 68, 2479-2488.
- Grashoff, C., Hoffman, B.D., Brenner, M.D., Zhou, R., Parsons, M., Yang, M.T., McLean, M.A., Sligar, S.G., Chen, C.S., Ha, T., et al. (2010). Measuring mechanical tension across vinculin reveals regulation of focal adhesion dynamics. *Nature* 466, 263-266.
- Gray-Schopfer, V.C., da Rocha Dias, S., and Marais, R. (2005). The role of B-RAF in melanoma. *Cancer Metastasis Rev* 24, 165-183.
- Greene, M.H., Clark, W.H., Jr., Tucker, M.A., Kraemer, K.H., Elder, D.E., and Fraser, M.C. (1985). High risk of malignant melanoma in melanoma-prone families with dysplastic nevi. *Ann Intern Med* 102, 458-465.
- Gressner, A.M., Weiskirchen, R., Breitkopf, K., and Dooley, S. (2002). Roles of TGF-beta in hepatic fibrosis. *Front Biosci* 7, d793-807.
- Grinnell, F., and Petroll, W.M. (2010). Cell motility and mechanics in three-dimensional collagen matrices. *Annu Rev Cell Dev Biol* 26, 335-361.
- Gritsenko, P.G., Ilina, O., and Friedl, P. (2012). Interstitial guidance of cancer invasion. *J Pathol* 226, 185-199.

- Grotegut, S., von Schweinitz, D., Christofori, G., and Lehenbre, F. (2006). Hepatocyte growth factor induces cell scattering through MAPK/Egr-1-mediated upregulation of Snail. *The EMBO journal* 25, 3534-3545.
- Gu, Z., Noss, E.H., Hsu, V.W., and Brenner, M.B. (2011). Integrins traffic rapidly via circular dorsal ruffles and macropinocytosis during stimulated cell migration. *The Journal of cell biology* 193, 61-70.
- Guan, J., Zhang, H., Wen, Z., Gu, Y., Cheng, Y., Sun, Y., Zhang, T., Jia, C., Lu, Z., and Chen, J. (2014). Retinoic acid inhibits pancreatic cancer cell migration and EMT through the downregulation of IL-6 in cancer associated fibroblast cells. *Cancer Lett* 345, 132-139.
- Gulhati, P., Bowen, K.A., Liu, J., Stevens, P.D., Rychahou, P.G., Chen, M., Lee, E.Y., Weiss, H.L., O'Connor, K.L., Gao, T., et al. (2011). mTORC1 and mTORC2 regulate EMT, motility, and metastasis of colorectal cancer via RhoA and Rac1 signaling pathways. *Cancer research* 71, 3246-3256.
- Guo, W., Keckesova, Z., Donaher, J.L., Shibue, T., Tischler, V., Reinhardt, F., Itzkovitz, S., Noske, A., Zurrer-Hardi, U., Bell, G., et al. (2012). Slug and Sox9 cooperatively determine the mammary stem cell state. *Cell* 148, 1015-1028.
- Haas, T.A., and Plow, E.F. (1994). Integrin-ligand interactions: a year in review. *Current opinion in cell biology* 6, 656-662.
- Haass, N.K., Smalley, K.S., Li, L., and Herlyn, M. (2005). Adhesion, migration and communication in melanocytes and melanoma. *Pigment cell research / sponsored by the European Society for Pigment Cell Research and the International Pigment Cell Society* 18, 150-159.
- Hachiya, A., Kobayashi, A., Yoshida, Y., Kitahara, T., Takema, Y., and Imokawa, G. (2004). Biphasic expression of two paracrine melanogenic cytokines, stem cell factor and endothelin-1, in ultraviolet B-induced human melanogenesis. *Am J Pathol* 165, 2099-2109.
- Haeger, A., Krause, M., Wolf, K., and Friedl, P. (2014). Cell jamming: collective invasion of mesenchymal tumor cells imposed by tissue confinement. *Biochimica et biophysica acta* 1840, 2386-2395.
- Haeger, A., Wolf, K., Zegers, M.M., and Friedl, P. (2015). Collective cell migration: guidance principles and hierarchies. *Trends in cell biology* 25, 556-566.
- Hahn, C.K., Berchuck, J.E., Ross, K.N., Kakoza, R.M., Clauser, K., Schinzel, A.C., Ross, L., Galinsky, I., Davis, T.N., Silver, S.J., et al. (2009). Proteomic and genetic approaches identify Syk as an AML target. *Cancer cell* 16, 281-294.
- Halaban, R., Langdon, R., Birchall, N., Cuono, C., Baird, A., Scott, G., Moellmann, G., and McGuire, J. (1988). Basic fibroblast growth factor from human keratinocytes is a natural mitogen for melanocytes. *The Journal of cell biology* 107, 1611-1619.
- Hall, C.L., Dubyk, C.W., Riesenberger, T.A., Shein, D., Keller, E.T., and van Golen, K.L. (2008). Type I collagen receptor (alpha2beta1) signaling promotes prostate cancer invasion through RhoC GTPase. *Neoplasia* 10, 797-803.
- Hamidi, H., Pietila, M., and Ivaska, J. (2016). The complexity of integrins in cancer and new scopes for therapeutic targeting. *British journal of cancer* 115, 1017-1023.
- Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144, 646-674.
- Hansen, S.M., Berezin, V., and Bock, E. (2008). Signaling mechanisms of neurite outgrowth induced by the cell adhesion molecules NCAM and N-cadherin. *Cell Mol Life Sci* 65, 3809-3821.
- Haraguchi, N., Ishii, H., Mimori, K., Ohta, K., Uemura, M., Nishimura, J., Hata, T., Takemasa, I., Mizushima, T., Yamamoto, H., et al. (2013). CD49f-positive cell population efficiently enriches colon cancer-initiating cells. *Int J Oncol* 43, 425-430.
- Harland, B., Walcott, S., and Sun, S.X. (2011). Adhesion dynamics and durotaxis in migrating cells. *Phys Biol* 8, 015011.
- Hashimoto, A., Okada, H., Jiang, A., Kurosaki, M., Greenberg, S., Clark, E.A., and Kurosaki, T. (1998). Involvement of guanosine triphosphatases and phospholipase C-gamma2 in extracellular signal-regulated kinase, c-Jun NH2-terminal kinase, and p38 mitogen-activated protein kinase activation by the B cell antigen receptor. *The Journal of experimental medicine* 188, 1287-1295.
- Hatton, O., Phillips, L.K., Vaysberg, M., Hurwich, J., Krams, S.M., and Martinez, O.M. (2011). Syk activation of phosphatidylinositol 3-kinase/Akt prevents HtrA2-dependent loss of X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP) to promote survival of Epstein-Barr virus+ (EBV+) B cell lymphomas. *The Journal of biological chemistry* 286, 37368-37378.
- Haynes, J., Srivastava, J., Madson, N., Wittmann, T., and Barber, D.L. (2011). Dynamic actin remodeling during epithelial-mesenchymal transition depends on increased moesin expression. *Molecular biology of the cell* 22, 4750-4764.
- Heidorn, S.J., Milagre, C., Whittaker, S., Nourry, A., Niculescu-Duvas, I., Dhomen, N., Hussain, J., Reis-Filho, J.S., Springer, C.J., Pritchard, C., et al. (2010). Kinase-dead BRAF and oncogenic RAS cooperate to drive tumor progression through CRAF. *Cell* 140, 209-221.

- Heit, B., Tavener, S., Raharjo, E., and Kubes, P. (2002). An intracellular signaling hierarchy determines direction of migration in opposing chemotactic gradients. *The Journal of cell biology* 159, 91-102.
- Heizmann, B., Reth, M., and Infantino, S. (2010). Syk is a dual-specificity kinase that self-regulates the signal output from the B-cell antigen receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 18563-18568.
- Helfrich, M.H., Nesbitt, S.A., Lakkakorpi, P.T., Barnes, M.J., Bodary, S.C., Shankar, G., Mason, W.T., Mendrick, D.L., Vaananen, H.K., and Horton, M.A. (1996). Beta 1 integrins and osteoclast function: involvement in collagen recognition and bone resorption. *Bone* 19, 317-328.
- Hendricks-Taylor, L.R., Motto, D.G., Zhang, J., Siraganian, R.P., and Koretzky, G.A. (1997). SLP-76 is a substrate of the high affinity IgE receptor-stimulated protein tyrosine kinases in rat basophilic leukemia cells. *The Journal of biological chemistry* 272, 1363-1367.
- Herlyn, M., Balaban, G., Bencicelli, J., Guerry, D.t., Halaban, R., Herlyn, D., Elder, D.E., Maul, G.G., Steplewski, Z., Nowell, P.C., et al. (1985). Primary melanoma cells of the vertical growth phase: similarities to metastatic cells. *J Natl Cancer Inst* 74, 283-289.
- Herman, S.E., Barr, P.M., McAuley, E.M., Liu, D., Wiestner, A., and Friedberg, J.W. (2013). Fostamatinib inhibits B-cell receptor signaling, cellular activation and tumor proliferation in patients with relapsed and refractory chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 27, 1769-1773.
- Herranz, N., Pasini, D., Diaz, V.M., Franci, C., Gutierrez, A., Dave, N., Escriva, M., Hernandez-Munoz, I., Di Croce, L., Helin, K., et al. (2008). Polycomb complex 2 is required for E-cadherin repression by the Snail1 transcription factor. *Molecular and cellular biology* 28, 4772-4781.
- Hirobe, T., Osawa, M., and Nishikawa, S. (2004). Hepatocyte growth factor controls the proliferation of cultured epidermal melanoblasts and melanocytes from newborn mice. *Pigment cell research / sponsored by the European Society for Pigment Cell Research and the International Pigment Cell Society* 17, 51-61.
- Hirschel, B.J., Gabbiani, G., Ryan, G.B., and Majno, G. (1971). Fibroblasts of granulation tissue: immunofluorescent staining with antismooth muscle serum. *Proc Soc Exp Biol Med* 138, 466-469.
- Hiscox, S., and Jiang, W.G. (1999). Association of the HGF/SF receptor, c-met, with the cell-surface adhesion molecule, E-cadherin, and catenins in human tumor cells. *Biochemical and biophysical research communications* 261, 406-411.
- Hitomi, T., Yanagi, S., Inatome, R., and Yamamura, H. (1999). Cross-linking of the B cell receptor induces activation of phospholipase D through Syk, Btk and phospholipase C-gamma2. *FEBS Lett* 445, 371-374.
- Hodis, E., Watson, I.R., Kryukov, G.V., Arold, S.T., Imielinski, M., Theurillat, J.P., Nickerson, E., Auclair, D., Li, L., Place, C., et al. (2012). A landscape of driver mutations in melanoma. *Cell* 150, 251-263.
- Hoek, K.S., Eichhoff, O.M., Schlegel, N.C., Dobbeling, U., Kobert, N., Schaerer, L., Hemmi, S., and Dummer, R. (2008). In vivo switching of human melanoma cells between proliferative and invasive states. *Cancer research* 68, 650-656.
- Hoeller, C., Thallinger, C., Pratscher, B., Bister, M.D., Schicher, N., Loewe, R., Heere-Ress, E., Roka, F., Sexl, V., and Pehamberger, H. (2005). The non-receptor-associated tyrosine kinase Syk is a regulator of metastatic behavior in human melanoma cells. *The Journal of investigative dermatology* 124, 1293-1299.
- Holtkotter, O., Nieswandt, B., Smyth, N., Muller, W., Hafner, M., Schulte, V., Krieg, T., and Eckes, B. (2002). Integrin alpha 2-deficient mice develop normally, are fertile, but display partially defective platelet interaction with collagen. *The Journal of biological chemistry* 277, 10789-10794.
- Homet Moreno, B., and Ribas, A. (2015). Anti-programmed cell death protein-1/ligand-1 therapy in different cancers. *British journal of cancer* 112, 1421-1427.
- Hong, J., Hu, K., Yuan, Y., Sang, Y., Bu, Q., Chen, G., Yang, L., Li, B., Huang, P., Chen, D., et al. (2012). CHK1 targets spleen tyrosine kinase (L) for proteolysis in hepatocellular carcinoma. *The Journal of clinical investigation* 122, 2165-2175.
- Hong, J., Yuan, Y., Wang, J., Liao, Y., Zou, R., Zhu, C., Li, B., Liang, Y., Huang, P., Wang, Z., et al. (2014). Expression of variant isoforms of the tyrosine kinase SYK determines the prognosis of hepatocellular carcinoma. *Cancer research* 74, 1845-1856.
- Hong, J., Zhou, J., Fu, J., He, T., Qin, J., Wang, L., Liao, L., and Xu, J. (2011). Phosphorylation of serine 68 of Twist1 by MAPKs stabilizes Twist1 protein and promotes breast cancer cell invasiveness. *Cancer research* 71, 3980-3990.
- Hoogland, A.M., Verhoef, E.I., Roobol, M.J., Schroder, F.H., Wildhagen, M.F., van der Kwast, T.H., Jenster, G., and van Leenders, G.J. (2014). Validation of stem cell markers in clinical prostate cancer: alpha6-integrin is predictive for non-aggressive disease. *Prostate* 74, 488-496.
- Hori, K., Sen, A., and Artavanis-Tsakonas, S. (2013). Notch signaling at a glance. *Journal of cell science* 126, 2135-2140.

- Hoshino, A., Costa-Silva, B., Shen, T.L., Rodrigues, G., Hashimoto, A., Tesic Mark, M., Molina, H., Kohsaka, S., Di Giannatale, A., Ceder, S., et al. (2015). Tumour exosome integrins determine organotropic metastasis. *Nature* 527, 329-335.
- Hotulainen, P., and Lappalainen, P. (2006). Stress fibers are generated by two distinct actin assembly mechanisms in motile cells. *The Journal of cell biology* 173, 383-394.
- Hsu, S., Thakar, R., Liepmann, D., and Li, S. (2005). Effects of shear stress on endothelial cell haptotaxis on micropatterned surfaces. *Biochemical and biophysical research communications* 337, 401-409.
- Hsu, V.W., Bai, M., and Li, J. (2012). Getting active: protein sorting in endocytic recycling. *Nature reviews Molecular cell biology* 13, 323-328.
- Huang, C., Park, C.C., Hilsenbeck, S.G., Ward, R., Rimawi, M.F., Wang, Y.C., Shou, J., Bissell, M.J., Osborne, C.K., and Schiff, R. (2011). beta1 integrin mediates an alternative survival pathway in breast cancer cells resistant to lapatinib. *Breast Cancer Res* 13, R84.
- Huang, R.Y., Guilford, P., and Thiery, J.P. (2012a). Early events in cell adhesion and polarity during epithelial-mesenchymal transition. *Journal of cell science* 125, 4417-4422.
- Huang, R.Y., Wong, M.K., Tan, T.Z., Kuay, K.T., Ng, A.H., Chung, V.Y., Chu, Y.S., Matsumura, N., Lai, H.C., Lee, Y.F., et al. (2013). An EMT spectrum defines an anoikis-resistant and spheroidogenic intermediate mesenchymal state that is sensitive to e-cadherin restoration by a src-kinase inhibitor, saracatinib (AZD0530). *Cell Death Dis* 4, e915.
- Huang, S., Holzel, M., Knijnenburg, T., Schlicker, A., Roepman, P., McDermott, U., Garnett, M., Grenrum, W., Sun, C., Prahallad, A., et al. (2012b). MED12 controls the response to multiple cancer drugs through regulation of TGF-beta receptor signaling. *Cell* 151, 937-950.
- Huber, M.A., Kraut, N., and Beug, H. (2005). Molecular requirements for epithelial-mesenchymal transition during tumor progression. *Current opinion in cell biology* 17, 548-558.
- Hug, E., Hobeika, E., Reth, M., and Jumaa, H. (2014). Inducible expression of hyperactive Syk in B cells activates Blimp-1-dependent terminal differentiation. *Oncogene* 33, 3730-3741.
- Hughes, C.E., Pollitt, A.Y., Mori, J., Eble, J.A., Tomlinson, M.G., Hartwig, J.H., O'Callaghan, C.A., Futterer, K., and Watson, S.P. (2010). CLEC-2 activates Syk through dimerization. *Blood* 115, 2947-2955.
- Hughes, P.E., Diaz-Gonzalez, F., Leong, L., Wu, C., McDonald, J.A., Shattil, S.J., and Ginsberg, M.H. (1996). Breaking the integrin hinge. A defined structural constraint regulates integrin signaling. *The Journal of biological chemistry* 271, 6571-6574.
- Humphries, J.D., Wang, P., Streuli, C., Geiger, B., Humphries, M.J., and Ballestrem, C. (2007). Vinculin controls focal adhesion formation by direct interactions with talin and actin. *The Journal of cell biology* 179, 1043-1057.
- Hunter, T. (2009). Tyrosine phosphorylation: thirty years and counting. *Current opinion in cell biology* 21, 140-146.
- Hur, S.S., Zhao, Y., Li, Y.S., Botvinick, E., and Chien, S. (2009). Live Cells Exert 3-Dimensional Traction Forces on Their Substrata. *Cell Mol Bioeng* 2, 425-436.
- Hussussian, C.J., Struewing, J.P., Goldstein, A.M., Higgins, P.A., Ally, D.S., Sheahan, M.D., Clark, W.H., Jr., Tucker, M.A., and Dracopoli, N.C. (1994). Germline p16 mutations in familial melanoma. *Nature genetics* 8, 15-21.
- Hynes, R.O. (1992). Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell* 69, 11-25.
- Hynes, R.O. (2002). Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* 110, 673-687.
- Iliina, O., Bakker, G.J., Vasaturo, A., Hofmann, R.M., and Friedl, P. (2011). Two-photon laser-generated microtracks in 3D collagen lattices: principles of MMP-dependent and -independent collective cancer cell invasion. *Phys Biol* 8, 015010.
- Imai, T., Horiuchi, A., Wang, C., Oka, K., Ohira, S., Nikaido, T., and Konishi, I. (2003). Hypoxia attenuates the expression of E-cadherin via up-regulation of SNAIL in ovarian carcinoma cells. *Am J Pathol* 163, 1437-1447.
- Imokawa, G., Kobayashi, T., Miyagishi, M., Higashi, K., and Yada, Y. (1997). The role of endothelin-1 in epidermal hyperpigmentation and signaling mechanisms of mitogenesis and melanogenesis. *Pigment cell research / sponsored by the European Society for Pigment Cell Research and the International Pigment Cell Society* 10, 218-228.
- Inatome, R., Yanagi, S., Takano, T., and Yamamura, H. (2001). A critical role for Syk in endothelial cell proliferation and migration. *Biochemical and biophysical research communications* 286, 195-199.
- Insall, R.H. (2010). Understanding eukaryotic chemotaxis: a pseudopod-centred view. *Nature reviews Molecular cell biology* 11, 453-458.
- Inuzuka, H., Fukushima, H., Shaik, S., Liu, P., Lau, A.W., and Wei, W. (2011). Mcl-1 ubiquitination and destruction. *Oncotarget* 2, 239-244.

- Irie, H.Y., Pearline, R.V., Grueneberg, D., Hsia, M., Ravichandran, P., Kothari, N., Natesan, S., and Brugge, J.S. (2005). Distinct roles of Akt1 and Akt2 in regulating cell migration and epithelial-mesenchymal transition. *The Journal of cell biology* 171, 1023-1034.
- Irish, J.M., Czerwinski, D.K., Nolan, G.P., and Levy, R. (2006). Altered B-cell receptor signaling kinetics distinguish human follicular lymphoma B cells from tumor-infiltrating nonmalignant B cells. *Blood* 108, 3135-3142.
- Ismail, A., and Bateman, A. (2009). Expression of TBX2 promotes anchorage-independent growth and survival in the p53-negative SW13 adrenocortical carcinoma. *Cancer Lett* 278, 230-240.
- Jhappan, C., Noonan, F.P., and Merlino, G. (2003). Ultraviolet radiation and cutaneous malignant melanoma. *Oncogene* 22, 3099-3112.
- Jiao, M., and Nan, K.J. (2012). Activation of PI3 kinase/Akt/HIF-1alpha pathway contributes to hypoxia-induced epithelial-mesenchymal transition and chemoresistance in hepatocellular carcinoma. *Int J Oncol* 40, 461-468.
- Jin, Q., Liu, C., Yan, C., Tao, B., Li, Z., and Cai, Z. (2012). 5-aza-CdR induces the demethylation of Syk promoter in nasopharyngeal carcinoma cell. *Gene* 511, 224-226.
- Jing, Y., Han, Z., Zhang, S., Liu, Y., and Wei, L. (2011). Epithelial-Mesenchymal Transition in tumor microenvironment. *Cell Biosci* 1, 29.
- Jinushi, M., Chiba, S., Baghdadi, M., Kinoshita, I., Dosaka-Akita, H., Ito, K., Yoshiyama, H., Yagita, H., Uede, T., and Takaoka, A. (2012). ATM-mediated DNA damage signals mediate immune escape through integrin-alpha v beta 3-dependent mechanisms. *Cancer research* 72, 56-65.
- Johnson, J.P. (1999). Cell adhesion molecules in the development and progression of malignant melanoma. *Cancer Metastasis Rev* 18, 345-357.
- Jones, R.G., Li, X., Gray, P.D., Kuang, J., Clayton, F., Samowitz, W.S., Madison, B.B., Gumucio, D.L., and Kuwada, S.K. (2006). Conditional deletion of beta1 integrins in the intestinal epithelium causes a loss of Hedgehog expression, intestinal hyperplasia, and early postnatal lethality. *The Journal of cell biology* 175, 505-514.
- Jorda, M., Olmeda, D., Vinyals, A., Valero, E., Cubillo, E., Llorens, A., Cano, A., and Fabra, A. (2005). Upregulation of MMP-9 in MDCK epithelial cell line in response to expression of the Snail transcription factor. *Journal of cell science* 118, 3371-3385.
- Joyce, J.A., and Pollard, J.W. (2009). Microenvironmental regulation of metastasis. *Nature reviews Cancer* 9, 239-252.
- Julien, S., Puig, I., Caretti, E., Bonaventure, J., Nelles, L., van Roy, F., Dargemont, C., de Herreros, A.G., Bellacosa, A., and Larue, L. (2007). Activation of NF-kappaB by Akt upregulates Snail expression and induces epithelium mesenchyme transition. *Oncogene* 26, 7445-7456.
- Juszczynski, P., Chen, L., O'Donnell, E., Polo, J.M., Ranuncolo, S.M., Dalla-Favera, R., Melnick, A., and Shipp, M.A. (2009). BCL6 modulates tonic BCR signaling in diffuse large B-cell lymphomas by repressing the SYK phosphatase, PTPROT. *Blood* 114, 5315-5321.
- Kahner, B.N., Kato, H., Banno, A., Ginsberg, M.H., Shattil, S.J., and Ye, F. (2012). Kindlins, integrin activation and the regulation of talin recruitment to alpha v beta 3. *PLoS One* 7, e34056.
- Kalluri, R., and Weinberg, R.A. (2009). The basics of epithelial-mesenchymal transition. *The Journal of clinical investigation* 119, 1420-1428.
- Kalluri, R., and Zeisberg, M. (2006). Fibroblasts in cancer. *Nature reviews Cancer* 6, 392-401.
- Kamb, A., Shattuck-Eidens, D., Eeles, R., Liu, Q., Gruis, N.A., Ding, W., Hussey, C., Tran, T., Miki, Y., Weaver-Feldhaus, J., et al. (1994). Analysis of the p16 gene (CDKN2) as a candidate for the chromosome 9p melanoma susceptibility locus. *Nature genetics* 8, 23-26.
- Kameyama, K., Montague, P.M., and Hearing, V.J. (1988). Expression of melanocyte stimulating hormone receptors correlates with mammalian pigmentation, and can be modulated by interferons. *J Cell Physiol* 137, 35-44.
- Kanda, R., Kawahara, A., Watari, K., Murakami, Y., Sonoda, K., Maeda, M., Fujita, H., Kage, M., Uramoto, H., Costa, C., et al. (2013). Erlotinib resistance in lung cancer cells mediated by integrin beta1/Src/Akt-driven bypass signaling. *Cancer research* 73, 6243-6253.
- Kang, Y., Chen, C.R., and Massague, J. (2003). A self-enabling TGFbeta response coupled to stress signaling: Smad engages stress response factor ATF3 for Id1 repression in epithelial cells. *Molecular cell* 11, 915-926.
- Kanie, T., Abe, A., Matsuda, T., Kuno, Y., Towatari, M., Yamamoto, T., Saito, H., Emi, N., and Naoe, T. (2004). TEL-Syk fusion constitutively activates PI3-K/Akt, MAPK and JAK2-independent STAT5 signal pathways. *Leukemia* 18, 548-555.

- Kaplon, J., Homig-Holzel, C., Gao, L., Meissl, K., Verdegaal, E.M., van der Burg, S.H., van Doorn, R., and Peeper, D.S. (2014). Near-genomewide RNAi screening for regulators of BRAF(V600E)-induced senescence identifies RASEF, a gene epigenetically silenced in melanoma. *Pigment cell & melanoma research* 27, 640-652.
- Karnoub, A.E., Dash, A.B., Vo, A.P., Sullivan, A., Brooks, M.W., Bell, G.W., Richardson, A.L., Polyak, K., Tubo, R., and Weinberg, R.A. (2007). Mesenchymal stem cells within tumour stroma promote breast cancer metastasis. *Nature* 449, 557-563.
- Katsuno, Y., Lamouille, S., and Derynck, R. (2013). TGF-beta signaling and epithelial-mesenchymal transition in cancer progression. *Curr Opin Oncol* 25, 76-84.
- Katz, E., Dubois-Marshall, S., Sims, A.H., Faratian, D., Li, J., Smith, E.S., Quinn, J.A., Edward, M., Meehan, R.R., Evans, E.E., et al. (2010). A gene on the HER2 amplicon, C35, is an oncogene in breast cancer whose actions are prevented by inhibition of Syk. *British journal of cancer* 103, 401-410.
- Katz, E., Lareef, M.H., Rassa, J.C., Grande, S.M., King, L.B., Russo, J., Ross, S.R., and Monroe, J.G. (2005). MMTV Env encodes an ITAM responsible for transformation of mammary epithelial cells in three-dimensional culture. *The Journal of experimental medicine* 201, 431-439.
- Kawakami, Y., Kitaura, J., Hartman, S.E., Lowell, C.A., Siraganian, R.P., and Kawakami, T. (2000). Regulation of protein kinase Cbeta1 by two protein-tyrosine kinases, Btk and Syk. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 7423-7428.
- Keshvara, L.M., Isaacson, C., Harrison, M.L., and Geahlen, R.L. (1997). Syk activation and dissociation from the B-cell antigen receptor is mediated by phosphorylation of tyrosine 130. *The Journal of biological chemistry* 272, 10377-10381.
- Kessenbrock, K., Dijkgraaf, G.J., Lawson, D.A., Littlepage, L.E., Shahi, P., Pieper, U., and Werb, Z. (2013). A role for matrix metalloproteinases in regulating mammary stem cell function via the Wnt signaling pathway. *Cell Stem Cell* 13, 300-313.
- Khan, Z., and Marshall, J.F. (2016). The role of integrins in TGFbeta activation in the tumour stroma. *Cell Tissue Res* 365, 657-673.
- Kim, D.H., Cho, S., and Wirtz, D. (2014). Tight coupling between nucleus and cell migration through the perinuclear actin cap. *Journal of cell science* 127, 2528-2541.
- Kim, H.J., Litzgenberger, B.C., Cui, X., Delgado, D.A., Grabiner, B.C., Lin, X., Lewis, M.T., Gottardis, M.M., Wong, T.W., Attar, R.M., et al. (2007). Constitutively active type I insulin-like growth factor receptor causes transformation and xenograft growth of immortalized mammary epithelial cells and is accompanied by an epithelial-to-mesenchymal transition mediated by NF-kappaB and snail. *Molecular and cellular biology* 27, 3165-3175.
- Kim, K., Lu, Z., and Hay, E.D. (2002). Direct evidence for a role of beta-catenin/LEF-1 signaling pathway in induction of EMT. *Cell Biol Int* 26, 463-476.
- Kim, M., Carman, C.V., and Springer, T.A. (2003). Bidirectional transmembrane signaling by cytoplasmic domain separation in integrins. *Science* 301, 1720-1725.
- Kim, Y., Kugler, M.C., Wei, Y., Kim, K.K., Li, X., Brumwell, A.N., and Chapman, H.A. (2009). Integrin alpha3beta1-dependent beta-catenin phosphorylation links epithelial Smad signaling to cell contacts. *The Journal of cell biology* 184, 309-322.
- Kinashi, T. (2012). Overview of integrin signaling in the immune system. *Methods in molecular biology* 757, 261-278.
- Kipps, T.J. (2003). Immunobiology of chronic lymphocytic leukemia. *Curr Opin Hematol* 10, 312-318.
- Kitaura, J., Song, J., Tsai, M., Asai, K., Maeda-Yamamoto, M., Mocsai, A., Kawakami, Y., Liu, F.T., Lowell, C.A., Barisas, B.G., et al. (2003). Evidence that IgE molecules mediate a spectrum of effects on mast cell survival and activation via aggregation of the FcepsilonRI. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 12911-12916.
- Klein-Goldberg, A., Maman, S., and Witz, I.P. (2014). The role played by the microenvironment in site-specific metastasis. *Cancer Lett* 352, 54-58.
- Klein, C.E., Dressel, D., Steinmayer, T., Mauch, C., Eckes, B., Krieg, T., Bankert, R.B., and Weber, L. (1991). Integrin alpha 2 beta 1 is upregulated in fibroblasts and highly aggressive melanoma cells in three-dimensional collagen lattices and mediates the reorganization of collagen I fibrils. *The Journal of cell biology* 115, 1427-1436.
- Knutson, K.L., Lu, H., Stone, B., Reiman, J.M., Behrens, M.D., Prosperi, C.M., Gad, E.A., Smorlesi, A., and Disis, M.L. (2006). Immunoediting of cancers may lead to epithelial to mesenchymal transition. *Journal of immunology* 177, 1526-1533.
- Kobayashi, M., Yoshiki, R., Sakabe, J., Kabashima, K., Nakamura, M., and Tokura, Y. (2009). Expression of toll-like receptor 2, NOD2 and dectin-1 and stimulatory effects of their ligands and histamine in normal human keratinocytes. *The British journal of dermatology* 160, 297-304.

- Kobayashi, T., Nakamura, S., Taniguchi, T., and Yamamura, H. (1990). Purification and characterization of a cytosolic protein-tyrosine kinase from porcine spleen. *European journal of biochemistry / FEBS* 188, 535-540.
- Koefinger, P., Wels, C., Joshi, S., Damm, S., Steinbauer, E., Beham-Schmid, C., Frank, S., Bergler, H., and Schaidler, H. (2011). The cadherin switch in melanoma instigated by HGF is mediated through epithelial-mesenchymal transition regulators. *Pigment cell & melanoma research* 24, 382-385.
- Koenig, A., Mueller, C., Hasel, C., Adler, G., and Menke, A. (2006). Collagen type I induces disruption of E-cadherin-mediated cell-cell contacts and promotes proliferation of pancreatic carcinoma cells. *Cancer research* 66, 4662-4671.
- Kohno, M., Yamasaki, S., Tybulewicz, V.L., and Saito, T. (2005). Rapid and large amount of autocrine IL-3 production is responsible for mast cell survival by IgE in the absence of antigen. *Blood* 105, 2059-2065.
- Kojima, Y., Acar, A., Eaton, E.N., Mellody, K.T., Scheel, C., Ben-Porath, I., Onder, T.T., Wang, Z.C., Richardson, A.L., Weinberg, R.A., et al. (2010). Autocrine TGF-beta and stromal cell-derived factor-1 (SDF-1) signaling drives the evolution of tumor-promoting mammary stromal myofibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 20009-20014.
- Kolsch, V., Charest, P.G., and Firtel, R.A. (2008). The regulation of cell motility and chemotaxis by phospholipid signaling. *Journal of cell science* 121, 551-559.
- Komoriya, A., Green, L.J., Mervic, M., Yamada, S.S., Yamada, K.M., and Humphries, M.J. (1991). The minimal essential sequence for a major cell type-specific adhesion site (CS1) within the alternatively spliced type III connecting segment domain of fibronectin is leucine-aspartic acid-valine. *The Journal of biological chemistry* 266, 15075-15079.
- Kondoh, H., and Kamachi, Y. (2010). SOX-partner code for cell specification: Regulatory target selection and underlying molecular mechanisms. *The international journal of biochemistry & cell biology* 42, 391-399.
- Kourtidis, A., Ngok, S.P., and Anastasiadis, P.Z. (2013). p120 catenin: an essential regulator of cadherin stability, adhesion-induced signaling, and cancer progression. *Prog Mol Biol Transl Sci* 116, 409-432.
- Kraus, M., Alimzhanov, M.B., Rajewsky, N., and Rajewsky, K. (2004). Survival of resting mature B lymphocytes depends on BCR signaling via the Igalpha/beta heterodimer. *Cell* 117, 787-800.
- Krause, D.S., and Van Etten, R.A. (2005). Tyrosine kinases as targets for cancer therapy. *The New England journal of medicine* 353, 172-187.
- Krauthammer, M., Kong, Y., Ha, B.H., Evans, P., Bacchicocchi, A., McCusker, J.P., Cheng, E., Davis, M.J., Goh, G., Choi, M., et al. (2012). Exome sequencing identifies recurrent somatic RAC1 mutations in melanoma. *Nature genetics* 44, 1006-1014.
- Krengel, S., Groteluschen, F., Bartsch, S., and Tronnier, M. (2004). Cadherin expression pattern in melanocytic tumors more likely depends on the melanocyte environment than on tumor cell progression. *J Cutan Pathol* 31, 1-7.
- Kriebel, P.W., Barr, V.A., Rericha, E.C., Zhang, G., and Parent, C.A. (2008). Collective cell migration requires vesicular trafficking for chemoattractant delivery at the trailing edge. *The Journal of cell biology* 183, 949-961.
- Krisenko, M.O., Cartagena, A., Raman, A., and Geahlen, R.L. (2015). Nanomechanical property maps of breast cancer cells as determined by multiharmonic atomic force microscopy reveal Syk-dependent changes in microtubule stability mediated by MAP1B. *Biochemistry* 54, 60-68.
- Krisenko, M.O., and Geahlen, R.L. (2015). Calling in SYK: SYK's dual role as a tumor promoter and tumor suppressor in cancer. *Biochimica et biophysica acta* 1853, 254-263.
- Kruihof, B.P., Duim, S.N., Moerkamp, A.T., and Goumans, M.J. (2012). TGFbeta and BMP signaling in cardiac cushion formation: lessons from mice and chicken. *Differentiation* 84, 89-102.
- Kudo-Saito, C., Shirako, H., Takeuchi, T., and Kawakami, Y. (2009). Cancer metastasis is accelerated through immunosuppression during Snail-induced EMT of cancer cells. *Cancer cell* 15, 195-206.
- Kuijpers, T.W., Van Lier, R.A., Hamann, D., de Boer, M., Thung, L.Y., Weening, R.S., Verhoeven, A.J., and Roos, D. (1997). Leukocyte adhesion deficiency type 1 (LAD-1)/variant. A novel immunodeficiency syndrome characterized by dysfunctional beta2 integrins. *The Journal of clinical investigation* 100, 1725-1733.
- Kulathu, Y., Hobeika, E., Turchinovich, G., and Reth, M. (2008). The kinase Syk as an adaptor controlling sustained calcium signalling and B-cell development. *The EMBO journal* 27, 1333-1344.
- Kumar, S., Maxwell, I.Z., Heisterkamp, A., Polte, T.R., Lele, T.P., Salanga, M., Mazur, E., and Ingber, D.E. (2006). Viscoelastic retraction of single living stress fibers and its impact on cell shape, cytoskeletal organization, and extracellular matrix mechanics. *Biophys J* 90, 3762-3773.
- Kuno, Y., Abe, A., Emi, N., Iida, M., Yokozawa, T., Towatari, M., Tanimoto, M., and Saito, H. (2001). Constitutive kinase activation of the TEL-Syk fusion gene in myelodysplastic syndrome with t(9;12)(q22;p12). *Blood* 97, 1050-1055.

- Kunze, E., Wendt, M., and Schlott, T. (2006). Promoter hypermethylation of the 14-3-3 sigma, SYK and CAGE-1 genes is related to the various phenotypes of urinary bladder carcinomas and associated with progression of transitional cell carcinomas. *Int J Mol Med* 18, 547-557.
- Kuo, J.C., Han, X., Hsiao, C.T., Yates, J.R., 3rd, and Waterman, C.M. (2011). Analysis of the myosin-II-responsive focal adhesion proteome reveals a role for beta-Pix in negative regulation of focal adhesion maturation. *Nat Cell Biol* 13, 383-393.
- Labelle-Cote, M., Dusseault, J., Ismail, S., Picard-Cloutier, A., Siegel, P.M., and Larose, L. (2011). Nck2 promotes human melanoma cell proliferation, migration and invasion in vitro and primary melanoma-derived tumor growth in vivo. *BMC Cancer* 11, 443.
- Lad, Y., Kiema, T., Jiang, P., Pentikainen, O.T., Coles, C.H., Campbell, I.D., Calderwood, D.A., and Ylanne, J. (2007). Structure of three tandem filamin domains reveals auto-inhibition of ligand binding. *The EMBO journal* 26, 3993-4004.
- Lakshminarayan, R., Wunder, C., Becken, U., Howes, M.T., Benzing, C., Arumugam, S., Sales, S., Ariotti, N., Chambon, V., Lamaze, C., et al. (2014). Galectin-3 drives glycosphingolipid-dependent biogenesis of clathrin-independent carriers. *Nat Cell Biol* 16, 595-606.
- Lam, K.P., Kuhn, R., and Rajewsky, K. (1997). In vivo ablation of surface immunoglobulin on mature B cells by inducible gene targeting results in rapid cell death. *Cell* 90, 1073-1083.
- Lamouille, S., Connolly, E., Smyth, J.W., Akhurst, R.J., and Derynck, R. (2012). TGF-beta-induced activation of mTOR complex 2 drives epithelial-mesenchymal transition and cell invasion. *Journal of cell science* 125, 1259-1273.
- Lamouille, S., Xu, J., and Derynck, R. (2014). Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. *Nature reviews Molecular cell biology* 15, 178-196.
- Lander R, Nordin K, LaBonne C. The F-box protein Ppa is a common regulator of core EMT factors Twist, Snail, Slug, and Sip1. *J Cell Biol.* 2011 Jul 11;194(1):17-25.
- Lange, J.R., and Fabry, B. (2013). Cell and tissue mechanics in cell migration. *Experimental cell research* 319, 2418-2423.
- Larbolette, O., Wollscheid, B., Schweikert, J., Nielsen, P.J., and Wienands, J. (1999). SH3P7 is a cytoskeleton adapter protein and is coupled to signal transduction from lymphocyte antigen receptors. *Molecular and cellular biology* 19, 1539-1546.
- Larive, R.M., Urbach, S., Poncet, J., Jouin, P., Mascré, G., Sahuquet, A., Mangeat, P.H., Coopman, P.J., and Bettache, N. (2009). Phosphoproteomic analysis of Syk kinase signaling in human cancer cells reveals its role in cell-cell adhesion. *Oncogene* 28, 2337-2347.
- Larkin, J., Ascierto, P.A., Dreno, B., Atkinson, V., Liskay, G., Maio, M., Mandalà, M., Demidov, L., Stryakovsky, D., Thomas, L., et al. (2014). Combined vemurafenib and cobimetinib in BRAF-mutated melanoma. *The New England journal of medicine* 371, 1867-1876.
- Larsen, M., Wei, C., and Yamada, K.M. (2006). Cell and fibronectin dynamics during branching morphogenesis. *Journal of cell science* 119, 3376-3384.
- Larue, L., and Beermann, F. (2007). Cutaneous melanoma in genetically modified animals. *Pigment cell research / sponsored by the European Society for Pigment Cell Research and the International Pigment Cell Society* 20, 485-497.
- Larue, L., and Delmas, V. (2006). The WNT/Beta-catenin pathway in melanoma. *Front Biosci* 11, 733-742.
- Lathia, J.D., Gallagher, J., Heddleston, J.M., Wang, J., Eyler, C.E., Macsworlds, J., Wu, Q., Vasanji, A., McLendon, R.E., Hjelmeland, A.B., et al. (2010). Integrin alpha 6 regulates glioblastoma stem cells. *Cell Stem Cell* 6, 421-432.
- Latour, S., Chow, L.M., and Veillette, A. (1996). Differential intrinsic enzymatic activity of Syk and Zap-70 protein-tyrosine kinases. *The Journal of biological chemistry* 271, 22782-22790.
- Latour, S., Fournel, M., and Veillette, A. (1997). Regulation of T-cell antigen receptor signalling by Syk tyrosine protein kinase. *Molecular and cellular biology* 17, 4434-4441.
- Latour, S., Zhang, J., Siraganian, R.P., and Veillette, A. (1998). A unique insert in the linker domain of Syk is necessary for its function in immunoreceptor signalling. *The EMBO journal* 17, 2584-2595.
- Laukaitis, C.M., Webb, D.J., Donais, K., and Horwitz, A.F. (2001). Differential dynamics of alpha 5 integrin, paxillin, and alpha-actinin during formation and disassembly of adhesions in migrating cells. *The Journal of cell biology* 153, 1427-1440.
- Lavelin, I., Wolfenson, H., Patla, I., Henis, Y.I., Medalia, O., Volberg, T., Livne, A., Kam, Z., and Geiger, B. (2013). Differential effect of actomyosin relaxation on the dynamic properties of focal adhesion proteins. *PLoS One* 8, e73549.

- Law, C.L., Chandran, K.A., Sidorenko, S.P., and Clark, E.A. (1996). Phospholipase C-gamma1 interacts with conserved phosphotyrosyl residues in the linker region of Syk and is a substrate for Syk. *Molecular and cellular biology* 16, 1305-1315.
- Layton, T., Stalens, C., Gunderson, F., Goodison, S., and Silletti, S. (2009). Syk tyrosine kinase acts as a pancreatic adenocarcinoma tumor suppressor by regulating cellular growth and invasion. *Am J Pathol* 175, 2625-2636.
- Lee, J.T., and Herlyn, M. (2007). Microenvironmental influences in melanoma progression. *J Cell Biochem* 101, 862-872.
- Lee, Y.H., Albig, A.R., Regner, M., Schiemann, B.J., and Schiemann, W.P. (2008). Fibulin-5 initiates epithelial-mesenchymal transition (EMT) and enhances EMT induced by TGF-beta in mammary epithelial cells via a MMP-dependent mechanism. *Carcinogenesis* 29, 2243-2251.
- Lehembre, F., Yilmaz, M., Wicki, A., Schomber, T., Strittmatter, K., Ziegler, D., Kren, A., Went, P., Derksen, P.W., Berns, A., et al. (2008). NCAM-induced focal adhesion assembly: a functional switch upon loss of E-cadherin. *The EMBO journal* 27, 2603-2615.
- Leiter, U., Meier, F., Schitteck, B., and Garbe, C. (2004). The natural course of cutaneous melanoma. *J Surg Oncol* 86, 172-178.
- Leseux, L., Hamdi, S.M., Al Saati, T., Capilla, F., Recher, C., Laurent, G., and Bezombes, C. (2006). Syk-dependent mTOR activation in follicular lymphoma cells. *Blood* 108, 4156-4162.
- Levy, C., Khaled, M., and Fisher, D.E. (2006). MITF: master regulator of melanocyte development and melanoma oncogene. *Trends Mol Med* 12, 406-414.
- Ley, K., Laudanna, C., Cybulsky, M.I., and Nourshargh, S. (2007). Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat Rev Immunol* 7, 678-689.
- Li, F.Z., Dhillon, A.S., Anderson, R.L., McArthur, G., and Ferrao, P.T. (2015). Phenotype switching in melanoma: implications for progression and therapy. *Front Oncol* 5, 31.
- Li, X., Deng, W., Nail, C.D., Bailey, S.K., Kraus, M.H., Ruppert, J.M., and Lobo-Ruppert, S.M. (2006). Snail induction is an early response to Gli1 that determines the efficiency of epithelial transformation. *Oncogene* 25, 609-621.
- Lin, K., Baritaki, S., Militello, L., Malaponte, G., Bevelacqua, Y., and Bonavida, B. (2010a). The Role of B-RAF Mutations in Melanoma and the Induction of EMT via Dysregulation of the NF-kappaB/Snail/RKIP/PTEN Circuit. *Genes Cancer* 1, 409-420.
- Lin, T., Ponn, A., Hu, X., Law, B.K., and Lu, J. (2010b). Requirement of the histone demethylase LSD1 in Snai1-mediated transcriptional repression during epithelial-mesenchymal transition. *Oncogene* 29, 4896-4904.
- Lin, Y., Wang, X., and Jin, H. (2014). EGFR-TKI resistance in NSCLC patients: mechanisms and strategies. *Am J Cancer Res* 4, 411-435.
- Linder, S. (2007). The matrix corroded: podosomes and invadopodia in extracellular matrix degradation. *Trends in cell biology* 17, 107-117.
- Linder, S., and Kopp, P. (2005). Podosomes at a glance. *Journal of cell science* 118, 2079-2082.
- Lipscomb, E.A., Simpson, K.J., Lyle, S.R., Ring, J.E., Dugan, A.S., and Mercurio, A.M. (2005). The alpha6beta4 integrin maintains the survival of human breast carcinoma cells in vivo. *Cancer research* 65, 10970-10976.
- Liu, P., Wakamiya, M., Shea, M.J., Albrecht, U., Behringer, R.R., and Bradley, A. (1999). Requirement for Wnt3 in vertebrate axis formation. *Nature genetics* 22, 361-365.
- Liu, Q., and Song, B. (2014). Electric field regulated signaling pathways. *The international journal of biochemistry & cell biology* 55, 264-268.
- Liu, S., Ren, S., Howell, P., Fodstad, O., and Riker, A.I. (2008). Identification of novel epigenetically modified genes in human melanoma via promoter methylation gene profiling. *Pigment cell & melanoma research* 21, 545-558.
- Lo, C.M., Wang, H.B., Dembo, M., and Wang, Y.L. (2000). Cell movement is guided by the rigidity of the substrate. *Biophys J* 79, 144-152.
- Lo, H.W., Hsu, S.C., Xia, W., Cao, X., Shih, J.Y., Wei, Y., Abbruzzese, J.L., Hortobagyi, G.N., and Hung, M.C. (2007). Epidermal growth factor receptor cooperates with signal transducer and activator of transcription 3 to induce epithelial-mesenchymal transition in cancer cells via up-regulation of TWIST gene expression. *Cancer research* 67, 9066-9076.
- Lo, P.K., Kanojia, D., Liu, X., Singh, U.P., Berger, F.G., Wang, Q., and Chen, H. (2012). CD49f and CD61 identify Her2/neu-induced mammary tumor-initiating cells that are potentially derived from luminal progenitors and maintained by the integrin-TGFbeta signaling. *Oncogene* 31, 2614-2626.

- Lobert, V.H., Brech, A., Pedersen, N.M., Wesche, J., Oppelt, A., Malerod, L., and Stenmark, H. (2010). Ubiquitination of alpha 5 beta 1 integrin controls fibroblast migration through lysosomal degradation of fibronectin-integrin complexes. *Developmental cell* 19, 148-159.
- Loercher, A.E., Tank, E.M., Delston, R.B., and Harbour, J.W. (2005). MITF links differentiation with cell cycle arrest in melanocytes by transcriptional activation of INK4A. *The Journal of cell biology* 168, 35-40.
- Long, G.V., Stroyakovskiy, D., Gogas, H., Levchenko, E., de Braud, F., Larkin, J., Garbe, C., Jouary, T., Hauschild, A., Grob, J.J., et al. (2014). Combined BRAF and MEK inhibition versus BRAF inhibition alone in melanoma. *The New England journal of medicine* 371, 1877-1888.
- Long, J., Zuo, D., and Park, M. (2005). Pc2-mediated sumoylation of Smad-interacting protein 1 attenuates transcriptional repression of E-cadherin. *The Journal of biological chemistry* 280, 35477-35489.
- Longo, P.G., Laurenti, L., Gobessi, S., Sica, S., Leone, G., and Efremov, D.G. (2008). The Akt/Mcl-1 pathway plays a prominent role in mediating antiapoptotic signals downstream of the B-cell receptor in chronic lymphocytic leukemia B cells. *Blood* 111, 846-855.
- Lowe, S.W., Cepero, E., and Evan, G. (2004). Intrinsic tumour suppression. *Nature* 432, 307-315.
- Lu, C., Sun, X., Sun, L., Sun, J., Lu, Y., Yu, X., Zhou, L., and Gao, X. (2013). Snail mediates PDGF-BB-induced invasion of rat bone marrow mesenchymal stem cells in 3D collagen and chick chorioallantoic membrane. *J Cell Physiol* 228, 1827-1833.
- Lu, J., Lin, W.H., Chen, S.Y., Longnecker, R., Tsai, S.C., Chen, C.L., and Tsai, C.H. (2006). Syk tyrosine kinase mediates Epstein-Barr virus latent membrane protein 2A-induced cell migration in epithelial cells. *The Journal of biological chemistry* 281, 8806-8814.
- Lu, Z., Ghosh, S., Wang, Z., and Hunter, T. (2003). Downregulation of caveolin-1 function by EGF leads to the loss of E-cadherin, increased transcriptional activity of beta-catenin, and enhanced tumor cell invasion. *Cancer cell* 4, 499-515.
- Luangdilok, S., Box, C., Patterson, L., Court, W., Harrington, K., Pitkin, L., Rhys-Evans, P., P, O.c., and Eccles, S. (2007). Syk tyrosine kinase is linked to cell motility and progression in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Cancer research* 67, 7907-7916.
- Luo, D., Wang, J., Li, J., and Post, M. (2011). Mouse snail is a target gene for HIF. *Mol Cancer Res* 9, 234-245.
- Lupher, M.L., Jr., Rao, N., Lill, N.L., Andoniou, C.E., Miyake, S., Clark, E.A., Druker, B., and Band, H. (1998). Cbl-mediated negative regulation of the Syk tyrosine kinase. A critical role for Cbl phosphotyrosine-binding domain binding to Syk phosphotyrosine 323. *The Journal of biological chemistry* 273, 35273-35281.
- Lynch, H.T., Fusaro, R.M., and Lynch, J. (1995). Hereditary cancer in adults. *Cancer Detect Prev* 19, 219-233.
- Mahabeleshwar, G.H., and Kundu, G.C. (2003). Syk, a protein-tyrosine kinase, suppresses the cell motility and nuclear factor kappa B-mediated secretion of urokinase type plasminogen activator by inhibiting the phosphatidylinositol 3'-kinase activity in breast cancer cells. *The Journal of biological chemistry* 278, 6209-6221.
- Maheshwari, G., and Lauffenburger, D.A. (1998). Deconstructing (and reconstructing) cell migration. *Microsc Res Tech* 43, 358-368.
- Mai, A., Muharram, G., Barrow-McGee, R., Baghirov, H., Rantala, J., Kermorgant, S., and Ivaska, J. (2014). Distinct c-Met activation mechanisms induce cell rounding or invasion through pathways involving integrins, RhoA and HIP1. *Journal of cell science* 127, 1938-1952.
- Majno, G., Gabbiani, G., Hirschel, B.J., Ryan, G.B., and Statkov, P.R. (1971). Contraction of granulation tissue in vitro: similarity to smooth muscle. *Science* 173, 548-550.
- Majumdar, R., Sixt, M., and Parent, C.A. (2014). New paradigms in the establishment and maintenance of gradients during directed cell migration. *Current opinion in cell biology* 30, 33-40.
- Makrodouli, E., Oikonomou, E., Koc, M., Andera, L., Sasazuki, T., Shirasawa, S., and Pintzas, A. (2011). BRAF and RAS oncogenes regulate Rho GTPase pathways to mediate migration and invasion properties in human colon cancer cells: a comparative study. *Mol Cancer* 10, 118.
- Malanchi, I., Santamaria-Martinez, A., Susanto, E., Peng, H., Lehr, H.A., Delaloye, J.F., and Huelsken, J. (2012). Interactions between cancer stem cells and their niche govern metastatic colonization. *Nature* 481, 85-89.
- Maman, S., Edry-Botzer, L., Sagi-Assif, O., Meshel, T., Yuan, W., Lu, W., and Witz, I.P. (2013). The metastatic microenvironment: lung-derived factors control the viability of neuroblastoma lung metastasis. *International journal of cancer Journal international du cancer* 133, 2296-2306.

- Mamane, Y., Petroulakis, E., LeBacquer, O., and Sonenberg, N. (2006). mTOR, translation initiation and cancer. *Oncogene* 25, 6416-6422.
- Mani, S.A., Guo, W., Liao, M.J., Eaton, E.N., Ayyanan, A., Zhou, A.Y., Brooks, M., Reinhard, F., Zhang, C.C., Shipitsin, M., et al. (2008). The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell* 133, 704-715.
- Mani, S.A., Yang, J., Brooks, M., Schwaninger, G., Zhou, A., Miura, N., Kutok, J.L., Hartwell, K., Richardson, A.L., and Weinberg, R.A. (2007). Mesenchyme Forkhead 1 (FOXC2) plays a key role in metastasis and is associated with aggressive basal-like breast cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 10069-10074.
- Martin, T.A., and Jiang, W.G. (2014). Evaluation of the expression of stem cell markers in human breast cancer reveals a correlation with clinical progression and metastatic disease in ductal carcinoma. *Oncol Rep* 31, 262-272.
- Maruyama, S., Kurosaki, T., Sada, K., Yamanashi, Y., Yamamoto, T., and Yamamura, H. (1996). Physical and functional association of cortactin with Syk in human leukemic cell line K562. *The Journal of biological chemistry* 271, 6631-6635.
- Masarachia, P., Yamamoto, M., Leu, C.T., Rodan, G., and Duong, L. (1998). Histomorphometric evidence for echistatin inhibition of bone resorption in mice with secondary hyperparathyroidism. *Endocrinology* 139, 1401-1410.
- Maschler, S., Wirl, G., Spring, H., Bredow, D.V., Sordat, I., Beug, H., and Reichmann, E. (2005). Tumor cell invasiveness correlates with changes in integrin expression and localization. *Oncogene* 24, 2032-2041.
- Massoumi, R., Kuphal, S., Hellerbrand, C., Haas, B., Wild, P., Spruss, T., Pfeifer, A., Fassler, R., and Bosserhoff, A.K. (2009). Down-regulation of CYLD expression by Snail promotes tumor progression in malignant melanoma. *The Journal of experimental medicine* 206, 221-232.
- Matsusaka, S., Tohyama, Y., He, J., Shi, Y., Hazama, R., Kadono, T., Kurihara, R., Tohyama, K., and Yamamura, H. (2005). Protein-tyrosine kinase, Syk, is required for CXCL12-induced polarization of B cells. *Biochemical and biophysical research communications* 328, 1163-1169.
- McCleverty, C.J., Lin, D.C., and Liddington, R.C. (2007). Structure of the PTB domain of tensin1 and a model for its recruitment to fibrillar adhesions. *Protein Sci* 16, 1223-1229.
- McDonald, O.G., Wu, H., Timp, W., Doi, A., and Feinberg, A.P. (2011). Genome-scale epigenetic reprogramming during epithelial-to-mesenchymal transition. *Nat Struct Mol Biol* 18, 867-874.
- McInturff, J.E., Modlin, R.L., and Kim, J. (2005). The role of toll-like receptors in the pathogenesis and treatment of dermatological disease. *The Journal of investigative dermatology* 125, 1-8.
- McNiven, M.A. (2013). Breaking away: matrix remodeling from the leading edge. *Trends in cell biology* 23, 16-21.
- Medema, J.P. (2013). Cancer stem cells: the challenges ahead. *Nat Cell Biol* 15, 338-344.
- Medici, D., Shore, E.M., Lounev, V.Y., Kaplan, F.S., Kalluri, R., and Olsen, B.R. (2010). Conversion of vascular endothelial cells into multipotent stem-like cells. *Nat Med* 16, 1400-1406.
- Meeth, K., Wang, J.X., Micevic, G., Damsky, W., Bosenberg, M.W. (2016). The YUMM lines: a series of congenic mouse melanoma cell lines with defined genetic alterations. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2016 Sep;29(5):590-7
- Mehrbod, M., and Mofrad, M.R. (2013). Localized lipid packing of transmembrane domains impedes integrin clustering. *PLoS Comput Biol* 9, e1002948.
- Mendez, M.G., Kojima, S., and Goldman, R.D. (2010). Vimentin induces changes in cell shape, motility, and adhesion during the epithelial to mesenchymal transition. *FASEB J* 24, 1838-1851.
- Mercado-Pimentel, M.E., and Runyan, R.B. (2007). Multiple transforming growth factor-beta isoforms and receptors function during epithelial-mesenchymal cell transformation in the embryonic heart. *Cells Tissues Organs* 185, 146-156.
- Merchant, M., Caldwell, R.G., and Longnecker, R. (2000). The LMP2A ITAM is essential for providing B cells with development and survival signals in vivo. *J Virol* 74, 9115-9124.
- Mercurio, A.M., Rabinovitz, I., and Shaw, L.M. (2001). The alpha 6 beta 4 integrin and epithelial cell migration. *Current opinion in cell biology* 13, 541-545.
- Miller, L.J., Schwarting, R., and Springer, T.A. (1986). Regulated expression of the Mac-1, LFA-1, p150,95 glycoprotein family during leukocyte differentiation. *Journal of immunology* 137, 2891-2900.
- Miller, P.G., Al-Shahrour, F., Hartwell, K.A., Chu, L.P., Jaras, M., Puram, R.V., Puissant, A., Callahan, K.P., Ashton, J., McConkey, M.E., et al. (2013). In Vivo RNAi screening identifies a leukemia-specific dependence on integrin beta 3 signaling. *Cancer cell* 24, 45-58.

- Mise, N., Savai, R., Yu, H., Schwarz, J., Kaminski, N., and Eickelberg, O. (2012). Zyxin is a transforming growth factor-beta (TGF-beta)/Smad3 target gene that regulates lung cancer cell motility via integrin alpha5beta1. *The Journal of biological chemistry* 287, 31393-31405.
- Mittelstadt, P.R., and DeFranco, A.L. (1993). Induction of early response genes by cross-linking membrane Ig on B lymphocytes. *Journal of immunology* 150, 4822-4832.
- Mocsai, A., Abram, C.L., Jakus, Z., Hu, Y., Lanier, L.L., and Lowell, C.A. (2006). Integrin signaling in neutrophils and macrophages uses adaptors containing immunoreceptor tyrosine-based activation motifs. *Nat Immunol* 7, 1326-1333.
- Mocsai, A., Ruland, J., and Tybulewicz, V.L. (2010). The SYK tyrosine kinase: a crucial player in diverse biological functions. *Nat Rev Immunol* 10, 387-402.
- Monroe, J.G. (2006). ITAM-mediated tonic signalling through pre-BCR and BCR complexes. *Nat Rev Immunol* 6, 283-294.
- Monsoro-Burg, A.H. (2005). Sclerotome development and morphogenesis: when experimental embryology meets genetics. *Int J Dev Biol* 49, 301-308.
- Montanez, E., Ussar, S., Schifferer, M., Bosl, M., Zent, R., Moser, M., and Fassler, R. (2008). Kindlin-2 controls bidirectional signaling of integrins. *Genes & development* 22, 1325-1330.
- Moody, S.E., Perez, D., Pan, T.C., Sarkisian, C.J., Portocarrero, C.P., Sterner, C.J., Notorfrancesco, K.L., Cardiff, R.D., and Chodosh, L.A. (2005). The transcriptional repressor Snail promotes mammary tumor recurrence. *Cancer cell* 8, 197-209.
- Moon, K.D., Post, C.B., Durden, D.L., Zhou, Q., De, P., Harrison, M.L., and Geahlen, R.L. (2005). Molecular basis for a direct interaction between the Syk protein-tyrosine kinase and phosphoinositide 3-kinase. *The Journal of biological chemistry* 280, 1543-1551.
- Moreno-Bueno, G., Portillo, F., and Cano, A. (2008). Transcriptional regulation of cell polarity in EMT and cancer. *Oncogene* 27, 6958-6969.
- Morgan, M.R., Byron, A., Humphries, M.J., and Bass, M.D. (2009). Giving off mixed signals--distinct functions of alpha5beta1 and alphavbeta3 integrins in regulating cell behaviour. *IUBMB Life* 61, 731-738.
- Mori, S., Kodaira, M., Ito, A., Okazaki, M., Kawaguchi, N., Hamada, Y., Takada, Y., and Matsuura, N. (2015). Enhanced Expression of Integrin alphavbeta3 Induced by TGF-beta Is Required for the Enhancing Effect of Fibroblast Growth Factor 1 (FGF1) in TGF-beta-Induced Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT) in Mammary Epithelial Cells. *PLoS One* 10, e0137486.
- Morita, T., Mayanagi, T., and Sobue, K. (2007). Dual roles of myocardin-related transcription factors in epithelial mesenchymal transition via slug induction and actin remodeling. *The Journal of cell biology* 179, 1027-1042.
- Morkel, M., Huelsken, J., Wakamiya, M., Ding, J., van de Wetering, M., Clevers, H., Taketo, M.M., Behringer, R.R., Shen, M.M., and Birchmeier, W. (2003). Beta-catenin regulates Cripto- and Wnt3-dependent gene expression programs in mouse axis and mesoderm formation. *Development* 130, 6283-6294.
- Moroni, M., Soldatenkov, V., Zhang, L., Zhang, Y., Stoica, G., Gehan, E., Rashidi, B., Singh, B., Ozdemirli, M., and Mueller, S.C. (2004). Progressive loss of Syk and abnormal proliferation in breast cancer cells. *Cancer research* 64, 7346-7354.
- Moser, M., Legate, K.R., Zent, R., and Fassler, R. (2009). The tail of integrins, talin, and kindlins. *Science* 324, 895-899.
- Moser, M., Nieswandt, B., Ussar, S., Pozgajova, M., and Fassler, R. (2008). Kindlin-3 is essential for integrin activation and platelet aggregation. *Nat Med* 14, 325-330.
- Moshfegh, K., Wuillemin, W.A., Redondo, M., Lammle, B., Beer, J.H., Liechti-Gallati, S., and Meyer, B.J. (1999). Association of two silent polymorphisms of platelet glycoprotein Ia/IIa receptor with risk of myocardial infarction: a case-control study. *Lancet* 353, 351-354.
- Mouneimne, G., Hansen, S.D., Selfors, L.M., Petrak, L., Hickey, M.M., Gallegos, L.L., Simpson, K.J., Lim, J., Gertler, F.B., Hartwig, J.H., et al. (2012). Differential remodeling of actin cytoskeleton architecture by profilin isoforms leads to distinct effects on cell migration and invasion. *Cancer cell* 22, 615-630.
- Mueller, S.C., and Chen, W.T. (1991). Cellular invasion into matrix beads: localization of beta 1 integrins and fibronectin to the invadopodia. *Journal of cell science* 99 (Pt 2), 213-225.
- Mulgrew, K., Kinner, K., Yao, X.T., Ward, B.K., Damschroder, M.M., Walsh, B., Mao, S.Y., Gao, C., Kiener, P.A., Coats, S., et al. (2006). Direct targeting of alphavbeta3 integrin on tumor cells with a monoclonal antibody, Abegrin. *Mol Cancer Ther* 5, 3122-3129.
- Muller, P.A., Caswell, P.T., Doyle, B., Iwanicki, M.P., Tan, E.H., Karim, S., Lukashchuk, N., Gillespie, D.A., Ludwig, R.L., Gosselin, P., et al. (2009). Mutant p53 drives invasion by promoting integrin recycling. *Cell* 139, 1327-1341.

- Munoz, M., Henderson, M., Haber, M., and Norris, M. (2007). Role of the MRP1/ABCC1 multidrug transporter protein in cancer. *IUBMB Life* 59, 752-757.
- Murphy, D.A., and Courtneidge, S.A. (2011). The 'ins' and 'outs' of podosomes and invadopodia: characteristics, formation and function. *Nature reviews Molecular cell biology* 12, 413-426.
- Muthusamy, V., Duraisamy, S., Bradbury, C.M., Hobbs, C., Curley, D.P., Nelson, B., and Bosenberg, M. (2006). Epigenetic silencing of novel tumor suppressors in malignant melanoma. *Cancer research* 66, 11187-11193.
- Nagai, K., Takata, M., Yamamura, H., and Kurosaki, T. (1995). Tyrosine phosphorylation of Shc is mediated through Lyn and Syk in B cell receptor signaling. *The Journal of biological chemistry* 270, 6824-6829.
- Nakahara, H., Mueller, S.C., Nomizu, M., Yamada, Y., Yeh, Y., and Chen, W.T. (1998). Activation of beta1 integrin signaling stimulates tyrosine phosphorylation of p190RhoGAP and membrane-protrusive activities at invadopodia. *The Journal of biological chemistry* 273, 9-12.
- Nakashima, H., Natsugoe, S., Ishigami, S., Okumura, H., Matsumoto, M., Hokita, S., and Aikou, T. (2006). Clinical significance of nuclear expression of spleen tyrosine kinase (Syk) in gastric cancer. *Cancer Lett* 236, 89-94.
- Narumiya, S., Tanji, M., and Ishizaki, T. (2009). Rho signaling, ROCK and mDia1, in transformation, metastasis and invasion. *Cancer Metastasis Rev* 28, 65-76.
- Natarajan, K., Xie, Y., Baer, M.R., and Ross, D.D. (2012). Role of breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) in cancer drug resistance. *Biochem Pharmacol* 83, 1084-1103.
- Nathanson, K.L., Martin, A.M., Wubbenhorst, B., Greshock, J., Letrero, R., D'Andrea, K., O'Day, S., Infante, J.R., Falchook, G.S., Arkenau, H.T., et al. (2013). Tumor genetic analyses of patients with metastatic melanoma treated with the BRAF inhibitor dabrafenib (GSK2118436). *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 19, 4868-4878.
- Navarro, C., Nola, S., Audebert, S., Santoni, M.J., Arsanto, J.P., Ginestier, C., Marchetto, S., Jacquemier, J., Isnardon, D., Le Bivic, A., et al. (2005). Junctional recruitment of mammalian Scribble relies on E-cadherin engagement. *Oncogene* 24, 4330-4339.
- Nawshad, A., LaGamba, D., and Hay, E.D. (2004). Transforming growth factor beta (TGFbeta) signalling in palatal growth, apoptosis and epithelial mesenchymal transformation (EMT). *Arch Oral Biol* 49, 675-689.
- Nelson, W.J. (2009). Remodeling epithelial cell organization: transitions between front-rear and apical-basal polarity. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 1, a000513.
- Nestle, F.O., Di Meglio, P., Qin, J.Z., and Nickoloff, B.J. (2009). Skin immune sentinels in health and disease. *Nat Rev Immunol* 9, 679-691.
- Nguyen, B.P., Ryan, M.C., Gil, S.G., and Carter, W.G. (2000). Deposition of laminin 5 in epidermal wounds regulates integrin signaling and adhesion. *Current opinion in cell biology* 12, 554-562.
- Nguyen, D.X., Bos, P.D., and Massague, J. (2009). Metastasis: from dissemination to organ-specific colonization. *Nature reviews Cancer* 9, 274-284.
- Niehrs, C. (2012). The complex world of WNT receptor signalling. *Nature reviews Molecular cell biology* 13, 767-779.
- Niessen, K., Fu, Y., Chang, L., Hoodless, P.A., McFadden, D., and Karsan, A. (2008). Slug is a direct Notch target required for initiation of cardiac cushion cellularization. *The Journal of cell biology* 182, 315-325.
- Nieto, M.A. (2011). The ins and outs of the epithelial to mesenchymal transition in health and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol* 27, 347-376.
- Nieto, M.A., Huang, R.Y., Jackson, R.A., and Thiery, J.P. (2016). EMT: 2016. *Cell* 166, 21-45.
- Nilsson, J., Helou, K., Kovacs, A., Bendahl, P.O., Bjursell, G., Ferno, M., Carlsson, P., and Kannius-Janson, M. (2010). Nuclear Janus-activated kinase 2/nuclear factor 1-C2 suppresses tumorigenesis and epithelial-to-mesenchymal transition by repressing Forkhead box F1. *Cancer research* 70, 2020-2029.
- Nishimura, G., Manabe, I., Tsushima, K., Fujiu, K., Oishi, Y., Imai, Y., Maemura, K., Miyagishi, M., Higashi, Y., Kondoh, H., et al. (2006). DeltaEF1 mediates TGF-beta signaling in vascular smooth muscle cell differentiation. *Developmental cell* 11, 93-104.
- Nistico, P., Bissell, M.J., and Radisky, D.C. (2012). Epithelial-mesenchymal transition: general principles and pathological relevance with special emphasis on the role of matrix metalloproteinases. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 4.
- Nitschke, L. (2005). The role of CD22 and other inhibitory co-receptors in B-cell activation. *Curr Opin Immunol* 17, 290-297.
- Noda, A., Ning, Y., Venable, S.F., Pereira-Smith, O.M., and Smith, J.R. (1994). Cloning of senescent cell-derived inhibitors of DNA synthesis using an expression screen. *Experimental cell research* 211, 90-98.

- Obergfell, A., Eto, K., Mocsai, A., Buensuceso, C., Moores, S.L., Brugge, J.S., Lowell, C.A., and Shattil, S.J. (2002). Coordinate interactions of Csk, Src, and Syk kinases with α IIb β 3 initiate integrin signaling to the cytoskeleton. *The Journal of cell biology* 157, 265-275.
- Ocana, O.H., Corcoles, R., Fabra, A., Moreno-Bueno, G., Acloque, H., Vega, S., Barrallo-Gimeno, A., Cano, A., and Nieto, M.A. (2012). Metastatic colonization requires the repression of the epithelial-mesenchymal transition inducer Prrx1. *Cancer cell* 22, 709-724.
- Oellerich, T., Oellerich, M.F., Engelke, M., Munch, S., Mohr, S., Nimz, M., Hsiao, H.H., Corso, J., Zhang, J., Bohnenberger, H., et al. (2013). β 2 integrin-derived signals induce cell survival and proliferation of AML blasts by activating a Syk/STAT signaling axis. *Blood* 121, 3889-3899, S3881-3866.
- Oh, H., Ozkirimli, E., Shah, K., Harrison, M.L., and Geahlen, R.L. (2007). Generation of an analog-sensitive Syk tyrosine kinase for the study of signaling dynamics from the B cell antigen receptor. *The Journal of biological chemistry* 282, 33760-33768.
- Okada, T., Maeda, A., Iwamatsu, A., Gotoh, K., and Kurosaki, T. (2000). BCAP: the tyrosine kinase substrate that connects B cell receptor to phosphoinositide 3-kinase activation. *Immunity* 13, 817-827.
- Okazaki, H., Zhang, J., Hamawy, M.M., and Siraganian, R.P. (1997). Activation of protein-tyrosine kinase Pyk2 is downstream of Syk in Fc ϵ RI signaling. *The Journal of biological chemistry* 272, 32443-32447.
- Omholt, K., Krockel, D., Ringborg, U., and Hansson, J. (2006). Mutations of PIK3CA are rare in cutaneous melanoma. *Melanoma Res* 16, 197-200.
- Oskarsson, T., Acharyya, S., Zhang, X.H., Vanharanta, S., Tavazoie, S.F., Morris, P.G., Downey, R.J., Manova-Todorova, K., Brogi, E., and Massague, J. (2011). Breast cancer cells produce tenascin C as a metastatic niche component to colonize the lungs. *Nat Med* 17, 867-874.
- Ota, Y., and Samelson, L.E. (1997). The product of the proto-oncogene c-cbl: a negative regulator of the Syk tyrosine kinase. *Science* 276, 418-420.
- Padua, R.A., Barrass, N.C., and Currie, G.A. (1985). Activation of N-ras in a human melanoma cell line. *Molecular and cellular biology* 5, 582-585.
- Paksa, A., and Raz, E. (2015). Zebrafish germ cells: motility and guided migration. *Current opinion in cell biology* 36, 80-85.
- Pao, L.I., Bedzyk, W.D., Persin, C., and Cambier, J.C. (1997). Molecular targets of CD45 in B cell antigen receptor signal transduction. *Journal of immunology* 158, 1116-1124.
- Papazoglou, E., Huang, Z.Y., Sunkari, C., and Uitto, J. (2011). The role of Syk kinase in ultraviolet-mediated skin damage. *The British journal of dermatology* 165, 69-77.
- Paraiso, K.H., Xiang, Y., Rebecca, V.W., Abel, E.V., Chen, Y.A., Munko, A.C., Wood, E., Fedorenko, I.V., Sondak, V.K., Anderson, A.R., et al. (2011). PTEN loss confers BRAF inhibitor resistance to melanoma cells through the suppression of BIM expression. *Cancer research* 71, 2750-2760.
- Park, I., and Lee, H.S. (2015). EphB/ephrinB signaling in cell adhesion and migration. *Mol Cells* 38, 14-19.
- Pechloff, K., Holch, J., Ferch, U., Schwenecker, M., Brunner, K., Kremer, M., Sparwasser, T., Quintanilla-Martinez, L., Zimmer-Strobl, U., Streubel, B., et al. (2010). The fusion kinase ITK-SYK mimics a T cell receptor signal and drives oncogenesis in conditional mouse models of peripheral T cell lymphoma. *The Journal of experimental medicine* 207, 1031-1044.
- Peinado, H., Aleckovic, M., Lavotshkin, S., Matei, I., Costa-Silva, B., Moreno-Bueno, G., Hergueta-Redondo, M., Williams, C., Garcia-Santos, G., Ghajar, C., et al. (2012). Melanoma exosomes educate bone marrow progenitor cells toward a pro-metastatic phenotype through MET. *Nat Med* 18, 883-891.
- Peinado, H., Ballestar, E., Esteller, M., and Cano, A. (2004a). Snail mediates E-cadherin repression by the recruitment of the Sin3A/histone deacetylase 1 (HDAC1)/HDAC2 complex. *Molecular and cellular biology* 24, 306-319.
- Peinado, H., Marin, F., Cubillo, E., Stark, H.J., Fusenig, N., Nieto, M.A., and Cano, A. (2004b). Snail and E47 repressors of E-cadherin induce distinct invasive and angiogenic properties in vivo. *Journal of cell science* 117, 2827-2839.
- Peinado, H., Olmeda, D., and Cano, A. (2007). Snail, Zeb and bHLH factors in tumour progression: an alliance against the epithelial phenotype? *Nature reviews Cancer* 7, 415-428.
- Pellegrin, S., and Mellor, H. (2007). Actin stress fibres. *Journal of cell science* 120, 3491-3499.
- Pellinen, T., and Ivaska, J. (2006). Integrin traffic. *Journal of cell science* 119, 3723-3731.
- Perova, T., Grandal, I., Nutter, L.M., Papp, E., Matei, I.R., Beyene, J., Kowalski, P.E., Hitzler, J.K., Minden, M.D., Guidos, C.J., et al. (2014). Therapeutic potential of spleen tyrosine kinase inhibition for treating high-risk precursor B cell acute lymphoblastic leukemia. *Science translational medicine* 6, 236ra262.

- Peters, J.D., Furlong, M.T., Asai, D.J., Harrison, M.L., and Geahlen, R.L. (1996). Syk, activated by cross-linking the B-cell antigen receptor, localizes to the cytosol where it interacts with and phosphorylates alpha-tubulin on tyrosine. *The Journal of biological chemistry* 271, 4755-4762.
- Petrie, R.J., and Yamada, K.M. (2012). At the leading edge of three-dimensional cell migration. *Journal of cell science* 125, 5917-5926.
- Petro, J.B., and Khan, W.N. (2001). Phospholipase C-gamma 2 couples Bruton's tyrosine kinase to the NF-kappaB signaling pathway in B lymphocytes. *The Journal of biological chemistry* 276, 1715-1719.
- Phillips, D.R., Charo, I.F., and Scarborough, R.M. (1991). GPIIb-IIIa: the responsive integrin. *Cell* 65, 359-362.
- Plow, E.F., Haas, T.A., Zhang, L., Loftus, J., and Smith, J.W. (2000). Ligand binding to integrins. *The Journal of biological chemistry* 275, 21785-21788.
- Plow, E.F., Qin, J., and Byzova, T. (2009). Kindling the flame of integrin activation and function with kindlins. *Curr Opin Hematol* 16, 323-328.
- Polsky, D., Bastian, B.C., Hazan, C., Melzer, K., Pack, J., Houghton, A., Busam, K., Cordon-Cardo, C., and Osman, I. (2001). HDM2 protein overexpression, but not gene amplification, is related to tumorigenesis of cutaneous melanoma. *Cancer research* 61, 7642-7646.
- Popperl, H., Schmidt, C., Wilson, V., Hume, C.R., Dodd, J., Krumlauf, R., and Beddington, R.S. (1997). Misexpression of *Cwnt8C* in the mouse induces an ectopic embryonic axis and causes a truncation of the anterior neuroectoderm. *Development* 124, 2997-3005.
- Porras, B.H., and Cockerell, C.J. (1997). Cutaneous malignant melanoma: classification and clinical diagnosis. *Semin Cutan Med Surg* 16, 88-96.
- Portella, G., Cumming, S.A., Liddell, J., Cui, W., Ireland, H., Akhurst, R.J., and Balmain, A. (1998). Transforming growth factor beta is essential for spindle cell conversion of mouse skin carcinoma in vivo: implications for tumor invasion. *Cell growth & differentiation : the molecular biology journal of the American Association for Cancer Research* 9, 393-404.
- Postigo, A.A. (2003). Opposing functions of ZEB proteins in the regulation of the TGFbeta/BMP signaling pathway. *The EMBO journal* 22, 2443-2452.
- Postigo, A.A., Depp, J.L., Taylor, J.J., and Kroll, K.L. (2003). Regulation of Smad signaling through a differential recruitment of coactivators and corepressors by ZEB proteins. *The EMBO journal* 22, 2453-2462.
- Poulikakos, P.I., Persaud, Y., Janakiraman, M., Kong, X., Ng, C., Moriceau, G., Shi, H., Atefi, M., Titz, B., Gabay, M.T., et al. (2011). RAF inhibitor resistance is mediated by dimerization of aberrantly spliced BRAF(V600E). *Nature* 480, 387-390.
- Powell, D.W., Adegboyega, P.A., Di Mari, J.F., and Mifflin, R.C. (2005). Epithelial cells and their neighbors I. Role of intestinal myofibroblasts in development, repair, and cancer. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 289, G2-7.
- Pozzi, A., Moberg, P.E., Miles, L.A., Wagner, S., Soloway, P., and Gardner, H.A. (2000). Elevated matrix metalloprotease and angiostatin levels in integrin alpha 1 knockout mice cause reduced tumor vascularization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 2202-2207.
- Prager-Khoutorsky, M., Lichtenstein, A., Krishnan, R., Rajendran, K., Mayo, A., Kam, Z., Geiger, B., and Bershadsky, A.D. (2011). Fibroblast polarization is a matrix-rigidity-dependent process controlled by focal adhesion mechanosensing. *Nat Cell Biol* 13, 1457-1465.
- Prinos, P., Garneau, D., Lucier, J.F., Gendron, D., Couture, S., Boivin, M., Brosseau, J.P., Lapointe, E., Thibault, P., Durand, M., et al. (2011). Alternative splicing of SYK regulates mitosis and cell survival. *Nat Struct Mol Biol* 18, 673-679.
- Psathas, J.N., Doonan, P.J., Raman, P., Freedman, B.D., Minn, A.J., and Thomas-Tikhonenko, A. (2013). The Myc-miR-17-92 axis amplifies B-cell receptor signaling via inhibition of ITIM proteins: a novel lymphomagenic feed-forward loop. *Blood* 122, 4220-4229.
- Puissant, A., Dufies, M., Fenouille, N., Ben Saha, I., Jacquelin, A., Robert, G., Cluzeau, T., Deckert, M., Tichet, M., Cheli, Y., et al. (2012). Imatinib triggers mesenchymal-like conversion of CML cells associated with increased aggressiveness. *J Mol Cell Biol* 4, 207-220.
- Puissant, A., Fenouille, N., Alexe, G., Pikman, Y., Bassil, C.F., Mehta, S., Du, J., Kazi, J.U., Luciano, F., Ronnstrand, L., et al. (2014). SYK is a critical regulator of FLT3 in acute myeloid leukemia. *Cancer cell* 25, 226-242.
- Puklin-Faucher, E., Gao, M., Schulten, K., and Vogel, V. (2006). How the headpiece hinge angle is opened: New insights into the dynamics of integrin activation. *The Journal of cell biology* 175, 349-360.
- Puklin-Faucher, E., and Sheetz, M.P. (2009). The mechanical integrin cycle. *Journal of cell science* 122, 179-186.

- Qiao, Y., Jiang, X., Lee, S.T., Karuturi, R.K., Hooi, S.C., and Yu, Q. (2011). FOXQ1 regulates epithelial-mesenchymal transition in human cancers. *Cancer research* 71, 3076-3086.
- Qin, S., Inazu, T., Takata, M., Kurosaki, T., Homma, Y., and Yamamura, H. (1996). Cooperation of tyrosine kinases p72syk and p53/56lyn regulates calcium mobilization in chicken B cell oxidant stress signaling. *European journal of biochemistry / FEBS* 236, 443-449.
- Qin, Y., Capaldo, C., Gumbiner, B.M., and Macara, I.G. (2005). The mammalian Scribble polarity protein regulates epithelial cell adhesion and migration through E-cadherin. *The Journal of cell biology* 171, 1061-1071.
- Radisky, D.C., Kenny, P.A., and Bissell, M.J. (2007). Fibrosis and cancer: do myofibroblasts come also from epithelial cells via EMT? *J Cell Biochem* 101, 830-839.
- Radisky, D.C., Levy, D.D., Littlepage, L.E., Liu, H., Nelson, C.M., Fata, J.E., Leake, D., Godden, E.L., Albertson, D.G., Nieto, M.A., et al. (2005). Rac1b and reactive oxygen species mediate MMP-3-induced EMT and genomic instability. *Nature* 436, 123-127.
- Ranadive, N.S., and Menon, I.A. (1986). Role of reactive oxygen species and free radicals from melanins in photoinduced cutaneous inflammations. *Pathol Immunopathol Res* 5, 118-139.
- Rangel, M.C., Karasawa, H., Castro, N.P., Nagaoka, T., Salomon, D.S., and Bianco, C. (2012). Role of Cripto-1 during epithelial-to-mesenchymal transition in development and cancer. *Am J Pathol* 180, 2188-2200.
- Ribeiro, A., Balasubramanian, S., Hughes, D., Vargo, S., Powell, E.M., and Leach, J.B. (2013). beta1-Integrin cytoskeletal signaling regulates sensory neuron response to matrix dimensionality. *Neuroscience* 248, 67-78.
- Richards, J.D., Dave, S.H., Chou, C.H., Mamchak, A.A., and DeFranco, A.L. (2001). Inhibition of the MEK/ERK signaling pathway blocks a subset of B cell responses to antigen. *Journal of immunology* 166, 3855-3864.
- Rickert, R.C. (2013). New insights into pre-BCR and BCR signalling with relevance to B cell malignancies. *Nat Rev Immunol* 13, 578-591.
- Ridley, A.J. (2011). Life at the leading edge. *Cell* 145, 1012-1022.
- Ridley, A.J., Schwartz, M.A., Burridge, K., Firtel, R.A., Ginsberg, M.H., Borisy, G., Parsons, J.T., and Horwitz, A.R. (2003). Cell migration: integrating signals from front to back. *Science* 302, 1704-1709.
- Rinaldi, A., Kwee, I., Tadorelli, M., Largo, C., Uccella, S., Martin, V., Poretti, G., Gaidano, G., Calabrese, G., Martinelli, G., et al. (2006). Genomic and expression profiling identifies the B-cell associated tyrosine kinase Syk as a possible therapeutic target in mantle cell lymphoma. *Br J Haematol* 132, 303-316.
- Robbins, J.R., McGuire, P.G., Wehrle-Haller, B., and Rogers, S.L. (1999). Diminished matrix metalloproteinase 2 (MMP-2) in ectomesenchyme-derived tissues of the Patch mutant mouse: regulation of MMP-2 by PDGF and effects on mesenchymal cell migration. *Dev Biol* 212, 255-263.
- Robert, C., and Ghiringhelli, F. (2009). What is the role of cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 blockade in patients with metastatic melanoma? *Oncologist* 14, 848-861.
- Robert, C., Ribas, A., Wolchok, J.D., Hodi, F.S., Hamid, O., Kefford, R., Weber, J.S., Joshua, A.M., Hwu, W.J., Gangadhar, T.C., et al. (2014). Anti-programmed-death-receptor-1 treatment with pembrolizumab in ipilimumab-refractory advanced melanoma: a randomised dose-comparison cohort of a phase 1 trial. *Lancet* 384, 1109-1117.
- Robert, C., Thomas, L., Bondarenko, I., O'Day, S., Weber, J., Garbe, C., Lebbe, C., Baurain, J.F., Testori, A., Grob, J.J., et al. (2011). Ipilimumab plus dacarbazine for previously untreated metastatic melanoma. *The New England journal of medicine* 364, 2517-2526.
- Robinson, S.D., and Hoidalva-Dilke, K.M. (2011). The role of beta3-integrins in tumor angiogenesis: context is everything. *Current opinion in cell biology* 23, 630-637.
- Rodrik-Outmezguine, V.S., Chandarlapaty, S., Pagano, N.C., Poulikakos, P.I., Scaltriti, M., Moskatel, E., Baselga, J., Guichard, S., and Rosen, N. (2011). mTOR kinase inhibition causes feedback-dependent biphasic regulation of AKT signaling. *Cancer discovery* 1, 248-259.
- Rogers, N.C., Slack, E.C., Edwards, A.D., Nolte, M.A., Schulz, O., Schweighoffer, E., Williams, D.L., Gordon, S., Tybulewicz, V.L., Brown, G.D., et al. (2005). Syk-dependent cytokine induction by Dectin-1 reveals a novel pattern recognition pathway for C type lectins. *Immunity* 22, 507-517.
- Rognoni, E., Widmaier, M., Jakobson, M., Ruppert, R., Ussar, S., Katsougkri, D., Bottcher, R.T., Lai-Cheong, J.E., Rifkin, D.B., McGrath, J.A., et al. (2014). Kindlin-1 controls Wnt and TGF-beta availability to regulate cutaneous stem cell proliferation. *Nat Med* 20, 350-359.
- Romano, L.A., and Runyan, R.B. (2000). Slug is an essential target of TGFbeta2 signaling in the developing chicken heart. *Dev Biol* 223, 91-102.

- Ross, R., Glomset, J., Kariya, B., and Harker, L. (1974). A platelet-dependent serum factor that stimulates the proliferation of arterial smooth muscle cells in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 71, 1207-1210.
- Roubinet, C., Tran, P.T., and Piel, M. (2012). Common mechanisms regulating cell cortex properties during cell division and cell migration. *Cytoskeleton (Hoboken)* 69, 957-972.
- Rowe, R.G., Li, X.Y., Hu, Y., Saunders, T.L., Virtanen, I., Garcia de Herreros, A., Becker, K.F., Ingvarsen, S., Engelholm, L.H., Bommer, G.T., et al. (2009). Mesenchymal cells reactivate Snail1 expression to drive three-dimensional invasion programs. *The Journal of cell biology* 184, 399-408.
- Rowe, R.G., and Weiss, S.J. (2009). Navigating ECM barriers at the invasive front: the cancer cell-stroma interface. *Annu Rev Cell Dev Biol* 25, 567-595.
- Rubin, K., Hook, M., Obrink, B., and Timpl, R. (1981). Substrate adhesion of rat hepatocytes: mechanism of attachment to collagen substrates. *Cell* 24, 463-470.
- Ruiz-Ballesteros, E., Mollejo, M., Rodriguez, A., Camacho, F.I., Algara, P., Martinez, N., Pollan, M., Sanchez-Aguilera, A., Menarguez, J., Campo, E., et al. (2005). Splenic marginal zone lymphoma: proposal of new diagnostic and prognostic markers identified after tissue and cDNA microarray analysis. *Blood* 106, 1831-1838.
- Ruvkun, G., and Hobert, O. (1998). The taxonomy of developmental control in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 282, 2033-2041.
- Sabass, B., Gardel, M.L., Waterman, C.M., and Schwarz, U.S. (2008). High resolution traction force microscopy based on experimental and computational advances. *Biophys J* 94, 207-220.
- Sada, K., Takano, T., Yanagi, S., and Yamamura, H. (2001). Structure and function of Syk protein-tyrosine kinase. *J Biochem* 130, 177-186.
- Sada, K., Zhang, J., and Siraganian, R.P. (2000). Point mutation of a tyrosine in the linker region of Syk results in a gain of function. *Journal of immunology* 164, 338-344.
- Saez-Ayala, M., Montenegro, M.F., Sanchez-Del-Campo, L., Fernandez-Perez, M.P., Chazarra, S., Freter, R., Middleton, M., Pinero-Madrona, A., Cabezas-Herrera, J., Goding, C.R., et al. (2013). Directed phenotype switching as an effective antimelanoma strategy. *Cancer cell* 24, 105-119.
- Sahlgren, C., Gustafsson, M.V., Jin, S., Poellinger, L., and Lendahl, U. (2008). Notch signaling mediates hypoxia-induced tumor cell migration and invasion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 6392-6397.
- Saitoh, S., Arudchandran, R., Manetz, T.S., Zhang, W., Sommers, C.L., Love, P.E., Rivera, J., and Samelson, L.E. (2000). LAT is essential for Fc(epsilon)RI-mediated mast cell activation. *Immunity* 12, 525-535.
- Sakai, D., Suzuki, T., Osumi, N., and Wakamatsu, Y. (2006). Cooperative action of Sox9, Snail2 and PKA signaling in early neural crest development. *Development* 133, 1323-1333.
- Sakai, T., Larsen, M., and Yamada, K.M. (2003). Fibronectin requirement in branching morphogenesis. *Nature* 423, 876-881.
- Samijo, S.K., Willigers, J.M., Barkhuysen, R., Kitslaar, P.J., Reneman, R.S., Brands, P.J., and Hoeks, A.P. (1998). Wall shear stress in the human common carotid artery as function of age and gender. *Cardiovasc Res* 39, 515-522.
- Sanchez-Tillo, E., Lazaro, A., Torrent, R., Cuatrecasas, M., Vaquero, E.C., Castells, A., Engel, P., and Postigo, A. (2010). ZEB1 represses E-cadherin and induces an EMT by recruiting the SWI/SNF chromatin-remodeling protein BRG1. *Oncogene* 29, 3490-3500.
- Sarmiento, C., Wang, W., Dovas, A., Yamaguchi, H., Sidani, M., El-Sibai, M., Desmarais, V., Holman, H.A., Kitchen, S., Backer, J.M., et al. (2008). WASP family members and formin proteins coordinate regulation of cell protrusions in carcinoma cells. *The Journal of cell biology* 180, 1245-1260.
- Satyamoorthy, K., Li, G., Vaidya, B., Kalabis, J., and Herlyn, M. (2002). Insulin-like growth factor-I-induced migration of melanoma cells is mediated by interleukin-8 induction. *Cell growth & differentiation : the molecular biology journal of the American Association for Cancer Research* 13, 87-93.
- Sauka-Spengler, T., and Bronner-Fraser, M. (2008). A gene regulatory network orchestrates neural crest formation. *Nature reviews Molecular cell biology* 9, 557-568.
- Savagner, P., Yamada, K.M., and Thiery, J.P. (1997). The zinc-finger protein slug causes desmosome dissociation, an initial and necessary step for growth factor-induced epithelial-mesenchymal transition. *The Journal of cell biology* 137, 1403-1419.
- Saxena, M., Stephens, M.A., Pathak, H., and Rangarajan, A. (2011). Transcription factors that mediate epithelial-mesenchymal transition lead to multidrug resistance by upregulating ABC transporters. *Cell Death Dis* 2, e179.
- Scarpa, E., and Mayor, R. (2016). Collective cell migration in development. *The Journal of cell biology* 212, 143-155.

- Schieven, G.L., Kiriwara, J.M., Burg, D.L., Geahlen, R.L., and Ledbetter, J.A. (1993). p72^{syk} tyrosine kinase is activated by oxidizing conditions that induce lymphocyte tyrosine phosphorylation and Ca²⁺ signals. *The Journal of biological chemistry* 268, 16688-16692.
- Schieven, G.L., Mittler, R.S., Nadler, S.G., Kiriwara, J.M., Bolen, J.B., Kanner, S.B., and Ledbetter, J.A. (1994). ZAP-70 tyrosine kinase, CD45, and T cell receptor involvement in UV- and H₂O₂-induced T cell signal transduction. *The Journal of biological chemistry* 269, 20718-20726.
- Schiller, H.B., Friedel, C.C., Boulegue, C., and Fassler, R. (2011). Quantitative proteomics of the integrin adhesome show a myosin II-dependent recruitment of LIM domain proteins. *EMBO reports* 12, 259-266.
- Schlesinger, M., and Bendas, G. (2015). Vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1)--an increasing insight into its role in tumorigenicity and metastasis. *International journal of cancer Journal international du cancer* 136, 2504-2514.
- Schnaper, H.W., Hayashida, T., Hubchak, S.C., and Poncelet, A.C. (2003). TGF-beta signal transduction and mesangial cell fibrogenesis. *Am J Physiol Renal Physiol* 284, F243-252.
- Schober, M., and Fuchs, E. (2011). Tumor-initiating stem cells of squamous cell carcinomas and their control by TGF-beta and integrin/focal adhesion kinase (FAK) signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 10544-10549.
- Schooley, A.M., Andrews, N.M., Zhao, H., and Addison, C.L. (2012). beta1 integrin is required for anchorage-independent growth and invasion of tumor cells in a context dependent manner. *Cancer Lett* 316, 157-167.
- Schor, S.L., and Court, J. (1979). Different mechanisms in the attachment of cells to native and denatured collagen. *Journal of cell science* 38, 267-281.
- Schulte, J., Weidig, M., Balzer, P., Richter, P., Franz, M., Junker, K., Gajda, M., Friedrich, K., Wunderlich, H., Ostman, A., et al. (2012). Expression of the E-cadherin repressors Snail, Slug and Zeb1 in urothelial carcinoma of the urinary bladder: relation to stromal fibroblast activation and invasive behaviour of carcinoma cells. *Histochem Cell Biol* 138, 847-860.
- Schweighoffer, E., Vanes, L., Nys, J., Cantrell, D., McCleary, S., Smithers, N., and Tybulewicz, V.L. (2013). The BAFF receptor transduces survival signals by co-opting the B cell receptor signaling pathway. *Immunity* 38, 475-488.
- Scita, G., and Di Fiore, P.P. (2010). The endocytic matrix. *Nature* 463, 464-473.
- Scolyer, R.A., Long, G.V., and Thompson, J.F. (2011). Evolving concepts in melanoma classification and their relevance to multidisciplinary melanoma patient care. *Molecular oncology* 5, 124-136.
- Seguin, L., Desgrosellier, J.S., Weis, S.M., and Cheresch, D.A. (2015). Integrins and cancer: regulators of cancer stemness, metastasis, and drug resistance. *Trends in cell biology* 25, 234-240.
- Seguin, L., Kato, S., Franovic, A., Camargo, M.F., Lesperance, J., Elliott, K.C., Yebra, M., Mielgo, A., Lowy, A.M., Husain, H., et al. (2014). An integrin beta(3)-KRAS-RalB complex drives tumour stemness and resistance to EGFR inhibition. *Nat Cell Biol* 16, 457-468.
- Serrano, M., Lin, A.W., McCurrach, M.E., Beach, D., and Lowe, S.W. (1997). Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell* 88, 593-602.
- Shackleton, M., Vaillant, F., Simpson, K.J., Stingl, J., Smyth, G.K., Asselin-Labat, M.L., Wu, L., Lindeman, G.J., and Visvader, J.E. (2006). Generation of a functional mammary gland from a single stem cell. *Nature* 439, 84-88.
- Shah, P.P., Fong, M.Y., and Kakar, S.S. (2012). PTTG induces EMT through integrin alphaVbeta3-focal adhesion kinase signaling in lung cancer cells. *Oncogene* 31, 3124-3135.
- Shao, Y., and Aplin, A.E. (2010). Akt3-mediated resistance to apoptosis in B-RAF-targeted melanoma cells. *Cancer research* 70, 6670-6681.
- Shapiro, I.M., Cheng, A.W., Flytzanis, N.C., Balsamo, M., Condeelis, J.S., Oktay, M.H., Burge, C.B., and Gertler, F.B. (2011). An EMT-driven alternative splicing program occurs in human breast cancer and modulates cellular phenotype. *PLoS genetics* 7, e1002218.
- Sheppard, D. (2005). Integrin-mediated activation of latent transforming growth factor beta. *Cancer Metastasis Rev* 24, 395-402.
- Shi, H., Hugo, W., Kong, X., Hong, A., Koya, R.C., Moriceau, G., Chodon, T., Guo, R., Johnson, D.B., Dahlman, K.B., et al. (2014). Acquired resistance and clonal evolution in melanoma during BRAF inhibitor therapy. *Cancer discovery* 4, 80-93.
- Shi, H., Kong, X., Ribas, A., and Lo, R.S. (2011). Combinatorial treatments that overcome PDGFRbeta-driven resistance of melanoma cells to V600EB-RAF inhibition. *Cancer research* 71, 5067-5074.
- Shibue, T., Brooks, M.W., Inan, M.F., Reinhardt, F., and Weinberg, R.A. (2012). The outgrowth of micrometastases is enabled by the formation of filopodium-like protrusions. *Cancer discovery* 2, 706-721.

- Shibue, T., and Weinberg, R.A. (2009). Integrin beta1-focal adhesion kinase signaling directs the proliferation of metastatic cancer cells disseminated in the lungs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 10290-10295.
- Shimaoka, M., and Springer, T.A. (2003). Therapeutic antagonists and conformational regulation of integrin function. *Nat Rev Drug Discov* 2, 703-716.
- Shin, D.H., Lee, H.J., Min, H.Y., Choi, S.P., Lee, M.S., Lee, J.W., Johnson, F.M., Mehta, K., Lippman, S.M., Glisson, B.S., et al. (2013). Combating resistance to anti-IGFR antibody by targeting the integrin beta3-Src pathway. *J Natl Cancer Inst* 105, 1558-1570.
- Shin, G., Kang, T.W., Yang, S., Baek, S.J., Jeong, Y.S., and Kim, S.Y. (2011). GENT: gene expression database of normal and tumor tissues. *Cancer Inform* 10, 149-157.
- Shinagawa, K., Kitadai, Y., Tanaka, M., Sumida, T., Onoyama, M., Ohnishi, M., Ohara, E., Higashi, Y., Tanaka, S., Yasui, W., et al. (2013). Stroma-directed imatinib therapy impairs the tumor-promoting effect of bone marrow-derived mesenchymal stem cells in an orthotopic transplantation model of colon cancer. *International journal of cancer Journal international du cancer* 132, 813-823.
- Shirakihara, T., Saitoh, M., and Miyazono, K. (2007). Differential regulation of epithelial and mesenchymal markers by deltaEF1 proteins in epithelial mesenchymal transition induced by TGF-beta. *Molecular biology of the cell* 18, 3533-3544.
- Shull, A.Y., Latham-Schwark, A., Ramasamy, P., Leskoske, K., Oroian, D., Birtwistle, M.R., and Buckhaults, P.J. (2012). Novel somatic mutations to PI3K pathway genes in metastatic melanoma. *PLoS One* 7, e43369.
- Shyjan, A.M., Bertagnolli, M., Kenney, C.J., and Briskin, M.J. (1996). Human mucosal addressin cell adhesion molecule-1 (MAdCAM-1) demonstrates structural and functional similarities to the alpha 4 beta 7-integrin binding domains of murine MAdCAM-1, but extreme divergence of mucin-like sequences. *Journal of immunology* 156, 2851-2857.
- Simon, M., Vanes, L., Geahlen, R.L., and Tybulewicz, V.L. (2005). Distinct roles for the linker region tyrosines of Syk in FcepsilonRI signaling in primary mast cells. *The Journal of biological chemistry* 280, 4510-4517.
- Singh, A., Greninger, P., Rhodes, D., Koopman, L., Violette, S., Bardeesy, N., and Settleman, J. (2009). A gene expression signature associated with "K-Ras addiction" reveals regulators of EMT and tumor cell survival. *Cancer cell* 15, 489-500.
- Singh, A., and Settleman, J. (2010). EMT, cancer stem cells and drug resistance: an emerging axis of evil in the war on cancer. *Oncogene* 29, 4741-4751.
- Singh, S.K., Hawkins, C., Clarke, I.D., Squire, J.A., Bayani, J., Hide, T., Henkelman, R.M., Cusimano, M.D., and Dirks, P.B. (2004). Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature* 432, 396-401.
- Singh, T., and Katiyar, S.K. (2011). Green tea catechins reduce invasive potential of human melanoma cells by targeting COX-2, PGE2 receptors and epithelial-to-mesenchymal transition. *PLoS One* 6, e25224.
- Skau, C.T., Plotnikov, S.V., Doyle, A.D., and Waterman, C.M. (2015). Inverted formin 2 in focal adhesions promotes dorsal stress fiber and fibrillar adhesion formation to drive extracellular matrix assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112, E2447-2456.
- Slorach, E.M., Chou, J., and Werb, Z. (2011). Zeppo1 is a novel metastasis promoter that represses E-cadherin expression and regulates p120-catenin isoform expression and localization. *Genes & development* 25, 471-484.
- Small, J.V., Rottner, K., Kaverina, I., and Anderson, K.I. (1998). Assembling an actin cytoskeleton for cell attachment and movement. *Biochimica et biophysica acta* 1404, 271-281.
- Smalley, K.S., Lioni, M., Dalla Palma, M., Xiao, M., Desai, B., Egyhazi, S., Hansson, J., Wu, H., King, A.J., Van Belle, P., et al. (2008). Increased cyclin D1 expression can mediate BRAF inhibitor resistance in BRAF V600E-mutated melanomas. *Mol Cancer Ther* 7, 2876-2883.
- Sohn, H.W., Gu, H., and Pierce, S.K. (2003). Cbl-b negatively regulates B cell antigen receptor signaling in mature B cells through ubiquitination of the tyrosine kinase Syk. *The Journal of experimental medicine* 197, 1511-1524.
- Soine, J.R., Brand, C.A., Stricker, J., Oakes, P.W., Gardel, M.L., and Schwarz, U.S. (2015). Model-based traction force microscopy reveals differential tension in cellular actin bundles. *PLoS Comput Biol* 11, e1004076.
- Song, Y., Washington, M.K., and Crawford, H.C. (2010). Loss of FOXA1/2 is essential for the epithelial-to-mesenchymal transition in pancreatic cancer. *Cancer research* 70, 2115-2125.
- Sonnemann, K.J., and Bement, W.M. (2011). Wound repair: toward understanding and integration of single-cell and multicellular wound responses. *Annu Rev Cell Dev Biol* 27, 237-263.
- Srinivasan, L., Sasaki, Y., Calado, D.P., Zhang, B., Paik, J.H., DePinho, R.A., Kutok, J.L., Kearney, J.F., Otipoby, K.L., and Rajewsky, K. (2009). PI3 kinase signals BCR-dependent mature B cell survival. *Cell* 139, 573-586.

- St Johnston, D., and Ahringer, J. (2010). Cell polarity in eggs and epithelia: parallels and diversity. *Cell* 141, 757-774.
- Stahl, J.M., Sharma, A., Cheung, M., Zimmerman, M., Cheng, J.Q., Bosenberg, M.W., Kester, M., Sandirasegarane, L., and Robertson, G.P. (2004). Deregulated Akt3 activity promotes development of malignant melanoma. *Cancer research* 64, 7002-7010.
- Starke, J., Wehrle-Haller, B., and Friedl, P. (2014). Plasticity of the actin cytoskeleton in response to extracellular matrix nanostructure and dimensionality. *Biochem Soc Trans* 42, 1356-1366.
- Steele, R.E., Stover, N.A., and Sakaguchi, M. (1999). Appearance and disappearance of Syk family protein-tyrosine kinase genes during metazoan evolution. *Gene* 239, 91-97.
- Steingrimsson, E., Copeland, N.G., and Jenkins, N.A. (2004). Melanocytes and the microphthalmia transcription factor network. *Annu Rev Genet* 38, 365-411.
- Stingl, J., Eirew, P., Ricketson, I., Shackleton, M., Vaillant, F., Choi, D., Li, H.I., and Eaves, C.J. (2006). Purification and unique properties of mammary epithelial stem cells. *Nature* 439, 993-997.
- Stoker, M., and Perryman, M. (1985). An epithelial scatter factor released by embryo fibroblasts. *Journal of cell science* 77, 209-223.
- Stoletov, K.V., Gong, C., and Terman, B.I. (2004). Nck and Crk mediate distinct VEGF-induced signaling pathways that serve overlapping functions in focal adhesion turnover and integrin activation. *Experimental cell research* 295, 258-268.
- Stratman, A.N., and Davis, G.E. (2012). Endothelial cell-pericyte interactions stimulate basement membrane matrix assembly: influence on vascular tube remodeling, maturation, and stabilization. *Microsc Microanal* 18, 68-80.
- Straussman, R., Morikawa, T., Shee, K., Barzily-Rokni, M., Qian, Z.R., Du, J., Davis, A., Mongare, M.M., Gould, J., Frederick, D.T., et al. (2012). Tumour micro-environment elicits innate resistance to RAF inhibitors through HGF secretion. *Nature* 487, 500-504.
- Strizzi, L., Bianco, C., Normanno, N., Seno, M., Wechselberger, C., Wallace-Jones, B., Khan, N.I., Hirota, M., Sun, Y., Sanicola, M., et al. (2004). Epithelial mesenchymal transition is a characteristic of hyperplasias and tumors in mammary gland from MMTV-Cripto-1 transgenic mice. *J Cell Physiol* 201, 266-276.
- Stupp, R., Hegi, M.E., Gorlia, T., Erridge, S.C., Perry, J., Hong, Y.K., Aldape, K.D., Lhermitte, B., Pietsch, T., Grujcic, D., et al. (2014). Cilengitide combined with standard treatment for patients with newly diagnosed glioblastoma with methylated MGMT promoter (CENTRIC EORTC 26071-22072 study): a multicentre, randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol* 15, 1100-1108.
- Stylli, S.S., Kaye, A.H., and Lock, P. (2008). Invadopodia: at the cutting edge of tumour invasion. *J Clin Neurosci* 15, 725-737.
- Suga, H., Koyanagi, M., Hoshiyama, D., Ono, K., Iwabe, N., Kuma, K., and Miyata, T. (1999). Extensive gene duplication in the early evolution of animals before the parazoan-eumetazoan split demonstrated by G proteins and protein tyrosine kinases from sponge and hydra. *J Mol Evol* 48, 646-653.
- Sugiyama, N., Gucciardo, E., Tatti, O., Varjosalo, M., Hyytiainen, M., Gstaiger, M., and Lehti, K. (2013). EphA2 cleavage by MT1-MMP triggers single cancer cell invasion via homotypic cell repulsion. *The Journal of cell biology* 201, 467-484.
- Sui, H., Zhu, L., Deng, W., and Li, Q. (2014). Epithelial-mesenchymal transition and drug resistance: role, molecular mechanisms, and therapeutic strategies. *Oncol Res Treat* 37, 584-589.
- Sullivan, N.J., Sasser, A.K., Axel, A.E., Vesuna, F., Raman, V., Ramirez, N., Oberyszyn, T.M., and Hall, B.M. (2009). Interleukin-6 induces an epithelial-mesenchymal transition phenotype in human breast cancer cells. *Oncogene* 28, 2940-2947.
- Sun, C., Wang, L., Huang, S., Heynen, G.J., Prahallad, A., Robert, C., Haanen, J., Blank, C., Wesseling, J., Willems, S.M., et al. (2014). Reversible and adaptive resistance to BRAF(V600E) inhibition in melanoma. *Nature* 508, 118-122.
- Sun, X., Meyers, E.N., Lewandoski, M., and Martin, G.R. (1999). Targeted disruption of Fgf8 causes failure of cell migration in the gastrulating mouse embryo. *Genes & development* 13, 1834-1846.
- Sung, Y.M., Xu, X., Sun, J., Mueller, D., Sentissi, K., Johnson, P., Urbach, E., Seillier-Moisewitsch, F., Johnson, M.D., and Mueller, S.C. (2009). Tumor suppressor function of Syk in human MCF10A in vitro and normal mouse mammary epithelium in vivo. *PLoS One* 4, e7445.
- Suzuki-Inoue, K., Fuller, G.L., Garcia, A., Eble, J.A., Pohlmann, S., Inoue, O., Gartner, T.K., Hughan, S.C., Pearce, A.C., Laing, G.D., et al. (2006). A novel Syk-dependent mechanism of platelet activation by the C-type lectin receptor CLEC-2. *Blood* 107, 542-549.
- Taddei, I., Deugnier, M.A., Faraldo, M.M., Petit, V., Bouvard, D., Medina, D., Fassler, R., Thiery, J.P., and Glukhova, M.A. (2008). Beta1 integrin deletion from the basal compartment of the mammary epithelium affects stem cells. *Nat Cell Biol* 10, 716-722.

- Takagi, J., Petre, B.M., Walz, T., and Springer, T.A. (2002). Global conformational rearrangements in integrin extracellular domains in outside-in and inside-out signaling. *Cell* 110, 599-511.
- Takagi, J., and Springer, T.A. (2002). Integrin activation and structural rearrangement. *Immunological reviews* 186, 141-163.
- Takata, M., Sabe, H., Hata, A., Inazu, T., Homma, Y., Nukada, T., Yamamura, H., and Kurosaki, T. (1994). Tyrosine kinases Lyn and Syk regulate B cell receptor-coupled Ca²⁺ mobilization through distinct pathways. *The EMBO journal* 13, 1341-1349.
- Takebe, N., Harris, P.J., Warren, R.Q., and Ivy, S.P. (2011). Targeting cancer stem cells by inhibiting Wnt, Notch, and Hedgehog pathways. *Nat Rev Clin Oncol* 8, 97-106.
- Talele, N.P., Fradette, J., Davies, J.E., Kapus, A., and Hinz, B. (2015). Expression of alpha-Smooth Muscle Actin Determines the Fate of Mesenchymal Stromal Cells. *Stem Cell Reports* 4, 1016-1030.
- Tang, Y., Rowe, R.G., Botvinick, E.L., Kurup, A., Putnam, A.J., Seiki, M., Weaver, V.M., Keller, E.T., Goldstein, S., Dai, J., et al. (2013). MT1-MMP-dependent control of skeletal stem cell commitment via a beta1-integrin/YAP/TAZ signaling axis. *Developmental cell* 25, 402-416.
- Tao, Q., Yokota, C., Puck, H., Kofron, M., Birsoy, B., Yan, D., Asashima, M., Wylie, C.C., Lin, X., and Heasman, J. (2005). Maternal wnt11 activates the canonical wnt signaling pathway required for axis formation in *Xenopus* embryos. *Cell* 120, 857-871.
- Tarakhovskiy, A., Turner, M., Schaal, S., Mee, P.J., Duddy, L.P., Rajewsky, K., and Tybulewicz, V.L. (1995). Defective antigen receptor-mediated proliferation of B and T cells in the absence of Vav. *Nature* 374, 467-470.
- Tartare-Deckert, S., Monthouel, M.N., Charvet, C., Foucault, I., Van Obberghen, E., Bernard, A., Altman, A., and Deckert, M. (2001). Vav2 activates c-fos serum response element and CD69 expression but negatively regulates nuclear factor of activated T cells and interleukin-2 gene activation in T lymphocyte. *The Journal of biological chemistry* 276, 20849-20857.
- Taube, J.H., Herschkowitz, J.I., Komurov, K., Zhou, A.Y., Gupta, S., Yang, J., Hartwell, K., Onder, T.T., Gupta, P.B., Evans, K.W., et al. (2010). Core epithelial-to-mesenchymal transition interactome gene-expression signature is associated with claudin-low and metaplastic breast cancer subtypes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 15449-15454.
- Tee, Y.H., Shemesh, T., Thiagarajan, V., Hariadi, R.F., Anderson, K.L., Page, C., Volkmann, N., Hanein, D., Sivaramakrishnan, S., Kozlov, M.M., et al. (2015). Cellular chirality arising from the self-organization of the actin cytoskeleton. *Nat Cell Biol* 17, 445-457.
- Tessier-Lavigne, M. (1994). Axon guidance by diffusible repellants and attractants. *Current opinion in genetics & development* 4, 596-601.
- Testori, A., Rutkowski, P., Marsden, J., Bastholt, L., Chiarion-Sileni, V., Hauschild, A., and Eggermont, A.M. (2009). Surgery and radiotherapy in the treatment of cutaneous melanoma. *Ann Oncol* 20 Suppl 6, vi22-29.
- Thannickal, V.J., and Fanburg, B.L. (2000). Reactive oxygen species in cell signaling. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 279, L1005-1028.
- Theveneau, E., Marchant, L., Kuriyama, S., Gull, M., Moepps, B., Parsons, M., and Mayor, R. (2010). Collective chemotaxis requires contact-dependent cell polarity. *Developmental cell* 19, 39-53.
- Theveneau, E., and Mayor, R. (2012). Cadherins in collective cell migration of mesenchymal cells. *Current opinion in cell biology* 24, 677-684.
- Theveneau, E., Steventon, B., Scarpa, E., Garcia, S., Trepac, X., Streit, A., and Mayor, R. (2013). Chase-and-run between adjacent cell populations promotes directional collective migration. *Nat Cell Biol* 15, 763-772.
- Thienpont B, Steinbacher J, Zhao H, D'Anna F, Kuchnio A, Ploumakis A, Ghesquière B, Van Dyck L, Boeckx B, Schoonjans L, Hermans E, Amant F, Kristensen VN, Koh KP, Mazzone M, Coleman ML, Carell T, Carmeliet P, Lambrechts D. Tumour hypoxia causes DNA hypermethylation by reducing TET activity. *Nature*. 2016 Aug 17;537(7618):63-68.
- Thiery, J.P., Acloque, H., Huang, R.Y., and Nieto, M.A. (2009). Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell* 139, 871-890.
- Thiery, J.P., and Sleeman, J.P. (2006). Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions. *Nature reviews Molecular cell biology* 7, 131-142.
- Thuault, S., Tan, E.J., Peinado, H., Cano, A., Heldin, C.H., and Moustakas, A. (2008). HMGA2 and Smads co-regulate SNAIL1 expression during induction of epithelial-to-mesenchymal transition. *The Journal of biological chemistry* 283, 33437-33446.
- Ticchioni, M., Charvet, C., Noraz, N., Lamy, L., Steinberg, M., Bernard, A., and Deckert, M. (2002). Signaling through ZAP-70 is required for CXCL12-mediated T-cell transendothelial migration. *Blood* 99, 3111-3118.

- Tichet M, Prod'Homme V, Fenouille N, Ambrosetti D, Mallavialle A, Cerezo M, Ohanna M, Audebert S, Rocchi S, Giacchero D, Boukari F, Allegra M, Chambard JC, Lacour JP, Michiels JF, Borg JP, Deckert M, Tartare-Deckert S. Tumour-derived SPARC drives vascular permeability and extravasation through endothelial VCAM1 signalling to promote metastasis. *Nat Commun.* 2015 Apr 30;6:6993.
- Tiger, C.F., Fougerousse, F., Grundstrom, G., Velling, T., and Gullberg, D. (2001). $\alpha 11\beta 1$ integrin is a receptor for interstitial collagens involved in cell migration and collagen reorganization on mesenchymal nonmuscle cells. *Dev Biol* 237, 116-129.
- Timmerman, L.A., Grego-Bessa, J., Raya, A., Bertran, E., Perez-Pomares, J.M., Diez, J., Aranda, S., Palomo, S., McCormick, F., Izpisua-Belmonte, J.C., et al. (2004). Notch promotes epithelial-mesenchymal transition during cardiac development and oncogenic transformation. *Genes & development* 18, 99-115.
- Tiwari, A., Jung, J.J., Inamdar, S.M., Brown, C.O., Goel, A., and Choudhury, A. (2011). Endothelial cell migration on fibronectin is regulated by syntaxin 6-mediated $\alpha 5\beta 1$ integrin recycling. *The Journal of biological chemistry* 286, 36749-36761.
- Tohyama, Y., Takano, T., and Yamamura, H. (2004). B cell responses to oxidative stress. *Curr Pharm Des* 10, 835-839.
- Toivola, D.M., Tao, G.Z., Habtezion, A., Liao, J., and Omary, M.B. (2005). Cellular integrity plus: organelle-related and protein-targeting functions of intermediate filaments. *Trends in cell biology* 15, 608-617.
- Tojkander, S., Gateva, G., Husain, A., Krishnan, R., and Lappalainen, P. (2015). Generation of contractile actomyosin bundles depends on mechanosensitive actin filament assembly and disassembly. *Elife* 4, e06126.
- Tong, Z.T., Cai, M.Y., Wang, X.G., Kong, L.L., Mai, S.J., Liu, Y.H., Zhang, H.B., Liao, Y.J., Zheng, F., Zhu, W., et al. (2012). EZH2 supports nasopharyngeal carcinoma cell aggressiveness by forming a co-repressor complex with HDAC1/HDAC2 and Snail to inhibit E-cadherin. *Oncogene* 31, 583-594.
- Torkaman, G. (2014). Electrical Stimulation of Wound Healing: A Review of Animal Experimental Evidence. *Adv Wound Care (New Rochelle)* 3, 202-218.
- Toyama, T., Iwase, H., Yamashita, H., Hara, Y., Omoto, Y., Sugiura, H., Zhang, Z., and Fujii, Y. (2003). Reduced expression of the Syk gene is correlated with poor prognosis in human breast cancer. *Cancer Lett* 189, 97-102.
- Truong, H.H., Xiong, J., Ghotra, V.P., Nirmala, E., Haazen, L., Le Devedec, S.E., Balcioglu, H.E., He, S., Snaar-Jagalska, B.E., Vreugdenhil, E., et al. (2014). $\beta 1$ integrin inhibition elicits a prometastatic switch through the TGF β -miR-200-ZEB network in E-cadherin-positive triple-negative breast cancer. *Science signaling* 7, ra15.
- Tseng, Y., Fedorov, E., McCaffery, J.M., Almo, S.C., and Wirtz, D. (2001). Micromechanics and ultrastructure of actin filament networks crosslinked by human fascin: a comparison with α -actinin. *J Mol Biol* 310, 351-366.
- Tsuchida, S., Yanagi, S., Inatome, R., Ding, J., Hermann, P., Tsujimura, T., Matsui, N., and Yamamura, H. (2000). Purification of a 72-kDa protein-tyrosine kinase from rat liver and its identification as Syk: involvement of Syk in signaling events of hepatocytes. *J Biochem* 127, 321-327.
- Tsujimura, T., Yanagi, S., Inatome, R., Takano, T., Ishihara, I., Mitsui, N., Takahashi, S., and Yamamura, H. (2001). Syk protein-tyrosine kinase is involved in neuron-like differentiation of embryonal carcinoma P19 cells. *FEBS Lett* 489, 129-133.
- Tucker, M.A., Halpern, A., Holly, E.A., Hartge, P., Elder, D.E., Sagebiel, R.W., Guerry, D.t., and Clark, W.H., Jr. (1997). Clinically recognized dysplastic nevi. A central risk factor for cutaneous melanoma. *JAMA* 277, 1439-1444.
- Tulla, M., Pentikainen, O.T., Viitasalo, T., Kapyla, J., Impola, U., Nykvist, P., Nissinen, L., Johnson, M.S., and Heino, J. (2001). Selective binding of collagen subtypes by integrin $\alpha 11$, $\alpha 21$, and $\alpha 101$ domains. *The Journal of biological chemistry* 276, 48206-48212.
- Tumbarello, D.A., Temple, J., and Brenton, J.D. (2012). $\text{ss}3$ integrin modulates transforming growth factor β induced (TGFB1) function and paclitaxel response in ovarian cancer cells. *Mol Cancer* 11, 36.
- Turner, M., and Billadeau, D.D. (2002). VAV proteins as signal integrators for multi-subunit immune-recognition receptors. *Nat Rev Immunol* 2, 476-486.
- Turner, M., Mee, P.J., Costello, P.S., Williams, O., Price, A.A., Duddy, L.P., Furlong, M.T., Geahlen, R.L., and Tybulewicz, V.L. (1995). Perinatal lethality and blocked B-cell development in mice lacking the tyrosine kinase Syk. *Nature* 378, 298-302.
- Turner, M., Schweighoffer, E., Colucci, F., Di Santo, J.P., and Tybulewicz, V.L. (2000). Tyrosine kinase SYK: essential functions for immunoreceptor signalling. *Immunology today* 21, 148-154.
- Uckun, F.M., Ek, R.O., Jan, S.T., Chen, C.L., and Qazi, S. (2010a). Targeting SYK kinase-dependent anti-apoptotic resistance pathway in B-lineage acute lymphoblastic leukaemia (ALL) cells with a potent SYK inhibitory pentapeptide mimic. *Br J Haematol* 149, 508-517.

- Uckun, F.M., Ma, H., Zhang, J., Ozer, Z., Dovat, S., Mao, C., Ishkhanian, R., Goodman, P., and Qazi, S. (2012). Serine phosphorylation by SYK is critical for nuclear localization and transcription factor function of Ikaros. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, 18072-18077.
- Uckun, F.M., Qazi, S., Cely, I., Sahin, K., Shahidzadeh, A., Ozercan, I., Yin, Q., Gaynon, P., Termuhlen, A., Cheng, J., et al. (2013). Nanoscale liposomal formulation of a SYK P-site inhibitor against B-precursor leukemia. *Blood* 121, 4348-4354.
- Uckun, F.M., Qazi, S., Ma, H., Tuel-Ahlgren, L., and Ozer, Z. (2010b). STAT3 is a substrate of SYK tyrosine kinase in B-lineage leukemia/lymphoma cells exposed to oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 2902-2907.
- Udyavar, A.R., Hoeksema, M.D., Clark, J.E., Zou, Y., Tang, Z., Li, Z., Li, M., Chen, H., Statnikov, A., Shyr, Y., et al. (2013). Co-expression network analysis identifies Spleen Tyrosine Kinase (SYK) as a candidate oncogenic driver in a subset of small-cell lung cancer. *BMC Syst Biol* 7 Suppl 5, S1.
- Ulanova, M., Marcet-Palacios, M., Munoz, S., Asfaha, S., Kim, M.K., Schreiber, A.D., and Befus, A.D. (2006). Involvement of Syk kinase in TNF-induced nitric oxide production by airway epithelial cells. *Biochemical and biophysical research communications* 351, 431-437.
- Ulanova, M., Puttagunta, L., Marcet-Palacios, M., Duszyk, M., Steinhoff, U., Duta, F., Kim, M.K., Indik, Z.K., Schreiber, A.D., and Befus, A.D. (2005). Syk tyrosine kinase participates in beta1-integrin signaling and inflammatory responses in airway epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 288, L497-507.
- Uramoto, H., Iwata, T., Onitsuka, T., Shimokawa, H., Hanagiri, T., and Oyama, T. (2010). Epithelial-mesenchymal transition in EGFR-TKI acquired resistant lung adenocarcinoma. *Anticancer Res* 30, 2513-2517.
- Urzainqui, A., Serrador, J.M., Viedma, F., Yanez-Mo, M., Rodriguez, A., Corbi, A.L., Alonso-Lebrero, J.L., Luque, A., Deckert, M., Vazquez, J., et al. (2002). ITAM-based interaction of ERM proteins with Syk mediates signaling by the leukocyte adhesion receptor PSGL-1. *Immunity* 17, 401-412.
- Valacca, C., Bonomi, S., Buratti, E., Pedrotti, S., Baralle, F.E., Sette, C., Ghigna, C., and Biamonti, G. (2010). Sam68 regulates EMT through alternative splicing-activated nonsense-mediated mRNA decay of the SF2/ASF proto-oncogene. *The Journal of cell biology* 191, 87-99.
- Valentin, G., Haas, P., and Gilmour, D. (2007). The chemokine SDF1a coordinates tissue migration through the spatially restricted activation of Cxcr7 and Cxcr4b. *Curr Biol* 17, 1026-1031.
- Valles, A.M., Boyer, B., Tarone, G., and Thiery, J.P. (1996). Alpha 2 beta 1 integrin is required for the collagen and FGF-1 induced cell dispersion in a rat bladder carcinoma cell line. *Cell Adhes Commun* 4, 187-199.
- van 't Veer, L.J., Burgering, B.M., Versteeg, R., Boot, A.J., Ruiter, D.J., Osanto, S., Schrier, P.I., and Bos, J.L. (1989). N-ras mutations in human cutaneous melanoma from sun-exposed body sites. *Molecular and cellular biology* 9, 3114-3116.
- Vandamme, N., and Berx, G. (2014). Melanoma cells revive an embryonic transcriptional network to dictate phenotypic heterogeneity. *Front Oncol* 4, 352.
- Vanderslice, P., and Woodside, D.G. (2006). Integrin antagonists as therapeutics for inflammatory diseases. *Expert Opin Investig Drugs* 15, 1235-1255.
- Vasilyev, A., and Drummond, I.A. (2010). Fluid flow and guidance of collective cell migration. *Cell Adh Migr* 4, 353-357.
- Vasilyev, A., Liu, Y., Mudumana, S., Mangos, S., Lam, P.Y., Majumdar, A., Zhao, J., Poon, K.L., Kondrychyn, I., Korzh, V., et al. (2009). Collective cell migration drives morphogenesis of the kidney nephron. *PLoS biology* 7, e9.
- Vella, L.J. (2014). The emerging role of exosomes in epithelial-mesenchymal-transition in cancer. *Front Oncol* 4, 361.
- Venkiteswaran, G., Lewellis, S.W., Wang, J., Reynolds, E., Nicholson, C., and Knaut, H. (2013). Generation and dynamics of an endogenous, self-generated signaling gradient across a migrating tissue. *Cell* 155, 674-687.
- Venkov, C.D., Link, A.J., Jennings, J.L., Plieth, D., Inoue, T., Nagai, K., Xu, C., Dimitrova, Y.N., Rauscher, F.J., and Neilson, E.G. (2007). A proximal activator of transcription in epithelial-mesenchymal transition. *The Journal of clinical investigation* 117, 482-491.
- Vincent, T., Neve, E.P., Johnson, J.R., Kukalev, A., Rojo, F., Albanell, J., Pietras, K., Virtanen, I., Philipson, L., Leopold, P.L., et al. (2009). A SNAIL1-SMAD3/4 transcriptional repressor complex promotes TGF-beta mediated epithelial-mesenchymal transition. *Nat Cell Biol* 11, 943-950.
- Viros, A., Sanchez-Laorden, B., Pedersen, M., Furney, S.J., Rae, J., Hogan, K., Ejima, S., Girotti, M.R., Cook, M., Dhomen, N., et al. (2014). Ultraviolet radiation accelerates BRAF-driven melanomagenesis by targeting TP53. *Nature* 511, 478-482.

- Visvader, J.E. (2009). Keeping abreast of the mammary epithelial hierarchy and breast tumorigenesis. *Genes & development* 23, 2563-2577.
- Visvader, J.E., and Lindeman, G.J. (2012). Cancer stem cells: current status and evolving complexities. *Cell Stem Cell* 10, 717-728.
- Vivanco, I., and Sawyers, C.L. (2002). The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. *Nature reviews Cancer* 2, 489-501.
- Vousden, K.H., and Lane, D.P. (2007). p53 in health and disease. *Nature reviews Molecular cell biology* 8, 275-283.
- Vu, H.L., Rosenbaum, S., Purwin, T.J., Davies, M.A., and Aplin, A.E. (2015). RAC1 P29S regulates PD-L1 expression in melanoma. *Pigment cell & melanoma research* 28, 590-598.
- Vultur, A., and Herlyn, M. (2013). SnapShot: melanoma. *Cancer cell* 23, 706-706 e701.
- Walker, G.J., Flores, J.F., Glendening, J.M., Lin, A.H., Markl, I.D., and Fountain, J.W. (1998). Virtually 100% of melanoma cell lines harbor alterations at the DNA level within CDKN2A, CDKN2B, or one of their downstream targets. *Genes Chromosomes Cancer* 22, 157-163.
- Wan, P., Wang, D., Luo, J., Chu, D., Wang, H., Zhang, L., and Chen, J. (2013). Guidance receptor promotes the asymmetric distribution of exocyst and recycling endosome during collective cell migration. *Development* 140, 4797-4806.
- Wanami, L.S., Chen, H.Y., Peiro, S., Garcia de Herreros, A., and Bachelder, R.E. (2008). Vascular endothelial growth factor-A stimulates Snail expression in breast tumor cells: implications for tumor progression. *Experimental cell research* 314, 2448-2453.
- Wandel, E., Raschke, A., Hildebrandt, G., Eberle, J., Dummer, R., Andereg, U., and Saalbach, A. (2002). Fibroblasts enhance the invasive capacity of melanoma cells in vitro. *Arch Dermatol Res* 293, 601-608.
- Wang, H., and Malbon, C.C. (1999). G(s)alpha repression of adipogenesis via Syk. *The Journal of biological chemistry* 274, 32159-32166.
- Wang, J., Scully, K., Zhu, X., Cai, L., Zhang, J., Prefontaine, G.G., Krones, A., Ohgi, K.A., Zhu, P., Garcia-Bassets, I., et al. (2007). Opposing LSD1 complexes function in developmental gene activation and repression programmes. *Nature* 446, 882-887.
- Wang, L., Devarajan, E., He, J., Reddy, S.P., and Dai, J.L. (2005). Transcription repressor activity of spleen tyrosine kinase mediates breast tumor suppression. *Cancer research* 65, 10289-10297.
- Wang, L., Duke, L., Zhang, P.S., Arlinghaus, R.B., Symmans, W.F., Sahin, A., Mendez, R., and Dai, J.L. (2003). Alternative splicing disrupts a nuclear localization signal in spleen tyrosine kinase that is required for invasion suppression in breast cancer. *Cancer research* 63, 4724-4730.
- Wang, S., Ding, Y.B., Chen, G.Y., Xia, J.G., and Wu, Z.Y. (2004). Hypermethylation of Syk gene in promoter region associated with oncogenesis and metastasis of gastric carcinoma. *World J Gastroenterol* 10, 1815-1818.
- Wang, S.P., Wang, W.L., Chang, Y.L., Wu, C.T., Chao, Y.C., Kao, S.H., Yuan, A., Lin, C.W., Yang, S.C., Chan, W.K., et al. (2009). p53 controls cancer cell invasion by inducing the MDM2-mediated degradation of Slug. *Nat Cell Biol* 11, 694-704.
- Wang, W.H., Childress, M.O., and Geahlen, R.L. (2014). Syk interacts with and phosphorylates nucleolin to stabilize Bcl-x(L) mRNA and promote cell survival. *Molecular and cellular biology* 34, 3788-3799.
- Warner, K., Weit, N., Crispatzu, G., Admirand, J., Jones, D., and Herling, M. (2013). T-cell receptor signaling in peripheral T-cell lymphoma - a review of patterns of alterations in a central growth regulatory pathway. *Curr Hematol Malig Rep* 8, 163-172.
- Weaver, A.M. (2008). Invadopodia. *Curr Biol* 18, R362-364.
- Weber, M., Hauschild, R., Schwarz, J., Mousson, C., de Vries, I., Legler, D.F., Luther, S.A., Bollenbach, T., and Sixt, M. (2013). Interstitial dendritic cell guidance by haptotactic chemokine gradients. *Science* 339, 328-332.
- Wegener, K.L., Partridge, A.W., Han, J., Pickford, A.R., Liddington, R.C., Ginsberg, M.H., and Campbell, I.D. (2007). Structural basis of integrin activation by talin. *Cell* 128, 171-182.
- Weigelin, B., Bakker, G.J., and Friedl, P. (2016). Third harmonic generation microscopy of cells and tissue organization. *Journal of cell science* 129, 245-255.
- Weijer, C.J. (2009). Collective cell migration in development. *Journal of cell science* 122, 3215-3223.
- Weiner, O.D., Marganski, W.A., Wu, L.F., Altschuler, S.J., and Kirschner, M.W. (2007). An actin-based wave generator organizes cell motility. *PLoS biology* 5, e221.

- Weis, S.M., and Cheresh, D.A. (2011a). α V integrins in angiogenesis and cancer. *Cold Spring Harb Perspect Med* 1, a006478.
- Weis, S.M., and Cheresh, D.A. (2011b). Tumor angiogenesis: molecular pathways and therapeutic targets. *Nat Med* 17, 1359-1370.
- Weis, S.M., and Cheresh, D.A. (2013). A wake-up call for hibernating tumour cells. *Nat Cell Biol* 15, 721-723.
- Wellbrock, C., Karasarides, M., and Marais, R. (2004). The RAF proteins take centre stage. *Nature reviews Molecular cell biology* 5, 875-885.
- Wellbrock, C., Rana, S., Paterson, H., Pickersgill, H., Brummelkamp, T., and Marais, R. (2008). Oncogenic BRAF regulates melanoma proliferation through the lineage specific factor MITF. *PLoS One* 3, e2734.
- Wels, C., Joshi, S., Koefinger, P., Bergler, H., and Schaidler, H. (2011). Transcriptional activation of ZEB1 by Slug leads to cooperative regulation of the epithelial-mesenchymal transition-like phenotype in melanoma. *The Journal of investigative dermatology* 131, 1877-1885.
- Whale, A., Hashim, F.N., Fram, S., Jones, G.E., and Wells, C.M. (2011). Signalling to cancer cell invasion through PAK family kinases. *Front Biosci (Landmark Ed)* 16, 849-864.
- Wheelock, M.J., Shintani, Y., Maeda, M., Fukumoto, Y., and Johnson, K.R. (2008). Cadherin switching. *Journal of cell science* 121, 727-735.
- White, D.J., Puranen, S., Johnson, M.S., and Heino, J. (2004). The collagen receptor subfamily of the integrins. *The international journal of biochemistry & cell biology* 36, 1405-1410.
- Williams, S., Couture, C., Gilman, J., Jascur, T., Deckert, M., Altman, A., and Mustelin, T. (1997). Reconstitution of T cell antigen receptor-induced Erk2 kinase activation in Lck-negative JCaM1 cells by Syk. *European journal of biochemistry / FEBS* 245, 84-90.
- Willis, B.C., and Borok, Z. (2007). TGF-beta-induced EMT: mechanisms and implications for fibrotic lung disease. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 293, L525-534.
- Willmore-Payne, C., Holden, J.A., Tripp, S., and Layfield, L.J. (2005). Human malignant melanoma: detection of BRAF- and c-kit-activating mutations by high-resolution amplicon melting analysis. *Hum Pathol* 36, 486-493.
- Wilson, T.R., Fridlyand, J., Yan, Y., Penuel, E., Burton, L., Chan, E., Peng, J., Lin, E., Wang, Y., Sosman, J., et al. (2012). Widespread potential for growth-factor-driven resistance to anticancer kinase inhibitors. *Nature* 487, 505-509.
- Witta, S.E., Gemmill, R.M., Hirsch, F.R., Coldren, C.D., Hedman, K., Ravdel, L., Helfrich, B., Dziadziuszko, R., Chan, D.C., Sugita, M., et al. (2006). Restoring E-cadherin expression increases sensitivity to epidermal growth factor receptor inhibitors in lung cancer cell lines. *Cancer research* 66, 944-950.
- Wittmann, T., Bokoch, G.M., and Waterman-Storer, C.M. (2003). Regulation of leading edge microtubule and actin dynamics downstream of Rac1. *The Journal of cell biology* 161, 845-851.
- Wolchok, J.D., Kluger, H., Callahan, M.K., Postow, M.A., Rizvi, N.A., Lesokhin, A.M., Segal, N.H., Ariyan, C.E., Gordon, R.A., Reed, K., et al. (2013). Nivolumab plus ipilimumab in advanced melanoma. *The New England journal of medicine* 369, 122-133.
- Wong, S., Guo, W.H., and Wang, Y.L. (2014). Fibroblasts probe substrate rigidity with filopodia extensions before occupying an area. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111, 17176-17181.
- Woodside, D.G., Obergfell, A., Talapatra, A., Calderwood, D.A., Shattil, S.J., and Ginsberg, M.H. (2002). The N-terminal SH2 domains of Syk and ZAP-70 mediate phosphotyrosine-independent binding to integrin beta cytoplasmic domains. *The Journal of biological chemistry* 277, 39401-39408.
- Wozniak, M.A., Modzelewska, K., Kwong, L., and Keely, P.J. (2004). Focal adhesion regulation of cell behavior. *Biochimica et biophysica acta* 1692, 103-119.
- Wu, H., Goel, V., and Haluska, F.G. (2003). PTEN signaling pathways in melanoma. *Oncogene* 22, 3113-3122.
- Wu, J., and Lin, F. (2014). Recent Developments in Electrotaxis Assays. *Adv Wound Care (New Rochelle)* 3, 149-155.
- Wu, J., Yang, J., and Klein, P.S. (2005). Neural crest induction by the canonical Wnt pathway can be dissociated from anterior-posterior neural patterning in *Xenopus*. *Dev Biol* 279, 220-232.
- Wu, N.L., Huang, D.Y., Wang, L.F., Kannagi, R., Fan, Y.C., and Lin, W.W. (2016). Spleen Tyrosine Kinase Mediates EGFR Signaling to Regulate Keratinocyte Terminal Differentiation. *The Journal of investigative dermatology* 136, 192-201.
- Wu, Y., Deng, J., Rychahou, P.G., Qiu, S., Evers, B.M., and Zhou, B.P. (2009a). Stabilization of snail by NF-kappaB is required for inflammation-induced cell migration and invasion. *Cancer cell* 15, 416-428.

- Wu, Y., Evers, B.M., and Zhou, B.P. (2009b). Small C-terminal domain phosphatase enhances snail activity through dephosphorylation. *The Journal of biological chemistry* 284, 640-648.
- Xi, Q., Wang, Z., Zaromytidou, A.I., Zhang, X.H., Chow-Tsang, L.F., Liu, J.X., Kim, H., Barlas, A., Manova-Todorova, K., Kaartinen, V., et al. (2011). A poised chromatin platform for TGF-beta access to master regulators. *Cell* 147, 1511-1524.
- Xiao, T., Takagi, J., Collier, B.S., Wang, J.H., and Springer, T.A. (2004). Structural basis for allostery in integrins and binding to fibrinogen-mimetic therapeutics. *Nature* 432, 59-67.
- Xie, M., He, C.S., Wei, S.H., and Zhang, L. (2013). Notch-1 contributes to epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor acquired resistance in non-small cell lung cancer in vitro and in vivo. *Eur J Cancer* 49, 3559-3572.
- Xie, M., Zhang, L., He, C.S., Xu, F., Liu, J.L., Hu, Z.H., Zhao, L.P., and Tian, Y. (2012). Activation of Notch-1 enhances epithelial-mesenchymal transition in gefitinib-acquired resistant lung cancer cells. *J Cell Biochem* 113, 1501-1513.
- Xing, F., Persaud, Y., Pratilas, C.A., Taylor, B.S., Janakiraman, M., She, Q.B., Gallardo, H., Liu, C., Merghoub, T., Hefter, B., et al. (2012). Concurrent loss of the PTEN and RB1 tumor suppressors attenuates RAF dependence in melanomas harboring (V600E)BRAF. *Oncogene* 31, 446-457.
- Xiong, J.P., Stehle, T., Goodman, S.L., and Arnaout, M.A. (2003). New insights into the structural basis of integrin activation. *Blood* 102, 1155-1159.
- Xu, C., Hasan, S.S., Schmidt, I., Rocha, S.F., Pitulescu, M.E., Bussmann, J., Meyen, D., Raz, E., Adams, R.H., and Siekmann, A.F. (2014). Arteries are formed by vein-derived endothelial tip cells. *Nature communications* 5, 5758.
- Xu, J., Lamouille, S., and Derynck, R. (2009). TGF-beta-induced epithelial to mesenchymal transition. *Cell Res* 19, 156-172.
- Xue, L., Wang, W.H., Iliuk, A., Hu, L., Galan, J.A., Yu, S., Hans, M., Geahlen, R.L., and Tao, W.A. (2012). Sensitive kinase assay linked with phosphoproteomics for identifying direct kinase substrates. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, 5615-5620.
- Yadav, A., Kumar, B., Datta, J., Teknos, T.N., and Kumar, P. (2011). IL-6 promotes head and neck tumor metastasis by inducing epithelial-mesenchymal transition via the JAK-STAT3-SNAIL signaling pathway. *Mol Cancer Res* 9, 1658-1667.
- Yaghini, F.A., Li, F., and Malik, K.U. (2007). Expression and mechanism of spleen tyrosine kinase activation by angiotensin II and its implication in protein synthesis in rat vascular smooth muscle cells. *The Journal of biological chemistry* 282, 16878-16890.
- Yamada, T., Fujieda, S., Yanagi, S., Yamamura, H., Inatome, R., Sunaga, H., and Saito, H. (2001). Protein-tyrosine kinase Syk expressed in human nasal fibroblasts and its effect on RANTES production. *Journal of immunology* 166, 538-543.
- Yamanashi, Y., Fukuda, T., Nishizumi, H., Inazu, T., Higashi, K., Kitamura, D., Ishida, T., Yamamura, H., Watanabe, T., and Yamamoto, T. (1997). Role of tyrosine phosphorylation of HS1 in B cell antigen receptor-mediated apoptosis. *The Journal of experimental medicine* 185, 1387-1392.
- Yajima, I., Belloir, E., Bourgeois, Y., Kumasaka, M., Delmas, V., and Larue, L. (2006). Spatiotemporal gene control by the Cre-ERT2 system in melanocytes. *Genesis* 44, 34-43.
- Yanagi, S., Inatome, R., Takano, T., and Yamamura, H. (2001). Syk expression and novel function in a wide variety of tissues. *Biochemical and biophysical research communications* 288, 495-498.
- Yanagisawa, H., Schluterman, M.K., and Brekken, R.A. (2009). Fibulin-5, an integrin-binding matricellular protein: its function in development and disease. *J Cell Commun Signal* 3, 337-347.
- Yang, A.D., Camp, E.R., Fan, F., Shen, L., Gray, M.J., Liu, W., Somcio, R., Bauer, T.W., Wu, Y., Hicklin, D.J., et al. (2006a). Vascular endothelial growth factor receptor-1 activation mediates epithelial to mesenchymal transition in human pancreatic carcinoma cells. *Cancer research* 66, 46-51.
- Yang, F., Sun, L., Li, Q., Han, X., Lei, L., Zhang, H., and Shang, Y. (2012). SET8 promotes epithelial-mesenchymal transition and confers TWIST dual transcriptional activities. *The EMBO journal* 31, 110-123.
- Yang, L., Lin, C., and Liu, Z.R. (2006b). P68 RNA helicase mediates PDGF-induced epithelial mesenchymal transition by displacing Axin from beta-catenin. *Cell* 127, 139-155.
- Yang, M.H., Hsu, D.S., Wang, H.W., Wang, H.J., Lan, H.Y., Yang, W.H., Huang, C.H., Kao, S.Y., Tzeng, C.H., Tai, S.K., et al. (2010). Bmi1 is essential in Twist1-induced epithelial-mesenchymal transition. *Nat Cell Biol* 12, 982-992.
- Yang, M.H., Wu, M.Z., Chiou, S.H., Chen, P.M., Chang, S.Y., Liu, C.J., Teng, S.C., and Wu, K.J. (2008). Direct regulation of TWIST by HIF-1alpha promotes metastasis. *Nat Cell Biol* 10, 295-305.

- Yang, X., Pursell, B., Lu, S., Chang, T.K., and Mercurio, A.M. (2009). Regulation of beta 4-integrin expression by epigenetic modifications in the mammary gland and during the epithelial-to-mesenchymal transition. *Journal of cell science* 122, 2473-2480.
- Yang, Z., Huo, L., Chen, H., Ni, B., Xiang, J., Kang, L., Wang, L., Peng, J., Yuan, Y., and Wang, J. (2013). Hypermethylation and prognostic implication of Syk gene in human colorectal cancer. *Med Oncol* 30, 586.
- Yang, Z., Rayala, S., Nguyen, D., Vadlamudi, R.K., Chen, S., and Kumar, R. (2005). Pak1 phosphorylation of snail, a master regulator of epithelial-to-mesenchyme transition, modulates snail's subcellular localization and functions. *Cancer research* 65, 3179-3184.
- Yankee, T.M., Keshvara, L.M., Sawadikoso, S., Harrison, M.L., and Geahlen, R.L. (1999). Inhibition of signaling through the B cell antigen receptor by the protooncogene product, c-Cbl, requires Syk tyrosine 317 and the c-Cbl phosphotyrosine-binding domain. *Journal of immunology* 163, 5827-5835.
- Yevick, H.G., Duclos, G., Bonnet, I., and Silberzan, P. (2015). Architecture and migration of an epithelium on a cylindrical wire. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112, 5944-5949.
- Yilmaz, M., and Christofori, G. (2009). EMT, the cytoskeleton, and cancer cell invasion. *Cancer Metastasis Rev* 28, 15-33.
- Yilmaz, M., and Christofori, G. (2010). Mechanisms of motility in metastasizing cells. *Mol Cancer Res* 8, 629-642.
- Yook, J.I., Li, X.Y., Ota, I., Hu, C., Kim, H.S., Kim, N.H., Cha, S.Y., Ryu, J.K., Choi, Y.J., Kim, J., et al. (2006). A Wnt-Axin2-GSK3beta cascade regulates Snail1 activity in breast cancer cells. *Nat Cell Biol* 8, 1398-1406.
- Yoshigi, M., Hoffman, L.M., Jensen, C.C., Yost, H.J., and Beckerle, M.C. (2005). Mechanical force mobilizes zyxin from focal adhesions to actin filaments and regulates cytoskeletal reinforcement. *The Journal of cell biology* 171, 209-215.
- Yoshioka, T., Otero, J., Chen, Y., Kim, Y.M., Koutcher, J.A., Satagopan, J., Reuter, V., Carver, B., de Stanchina, E., Enomoto, K., et al. (2013). beta4 Integrin signaling induces expansion of prostate tumor progenitors. *The Journal of clinical investigation* 123, 682-699.
- Youle, R.J., and Strasser, A. (2008). The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nature reviews Molecular cell biology* 9, 47-59.
- Young, R.M., Hardy, I.R., Clarke, R.L., Lundy, N., Pine, P., Turner, B.C., Potter, T.A., and Refaeli, Y. (2009). Mouse models of non-Hodgkin lymphoma reveal Syk as an important therapeutic target. *Blood* 113, 2508-2516.
- Yu, H., and Jove, R. (2004). The STATs of cancer--new molecular targets come of age. *Nature reviews Cancer* 4, 97-105.
- Yu, J., and Zhang, L. (2005). The transcriptional targets of p53 in apoptosis control. *Biochemical and biophysical research communications* 331, 851-858.
- Yuan, Y., Mendez, R., Sahin, A., and Dai, J.L. (2001). Hypermethylation leads to silencing of the SYK gene in human breast cancer. *Cancer research* 61, 5558-5561.
- Yuan, Y., Wang, J., Li, J., Wang, L., Li, M., Yang, Z., Zhang, C., and Dai, J.L. (2006). Frequent epigenetic inactivation of spleen tyrosine kinase gene in human hepatocellular carcinoma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 12, 6687-6695.
- Zaidel-Bar, R., Ballestrem, C., Kam, Z., and Geiger, B. (2003). Early molecular events in the assembly of matrix adhesions at the leading edge of migrating cells. *Journal of cell science* 116, 4605-4613.
- Zaidel-Bar, R., and Geiger, B. (2010). The switchable integrin adhesome. *Journal of cell science* 123, 1385-1388.
- Zaidel-Bar, R., Itzkovitz, S., Ma'ayan, A., Iyengar, R., and Geiger, B. (2007). Functional atlas of the integrin adhesome. *Nat Cell Biol* 9, 858-867.
- Zaidi, M.R., De Fabo, E.C., Noonan, F.P., and Merlino, G. (2012). Shedding light on melanocyte pathobiology in vivo. *Cancer research* 72, 1591-1595.
- Zamboni-Zallone, A., Teti, A., Grano, M., Rubinacci, A., Abbadini, M., Gaboli, M., and Marchisio, P.C. (1989). Immunocytochemical distribution of extracellular matrix receptors in human osteoclasts: a beta 3 integrin is colocalized with vinculin and talin in the podosomes of osteoclastoma giant cells. *Experimental cell research* 182, 645-652.
- Zamir, E., and Geiger, B. (2001). Molecular complexity and dynamics of cell-matrix adhesions. *Journal of cell science* 114, 3583-3590.
- Zavadil, J., and Bottinger, E.P. (2005). TGF-beta and epithelial-to-mesenchymal transitions. *Oncogene* 24, 5764-5774.
- Zavala, V.A., and Kalgis, A.M. (2015). New clinical advances in immunotherapy for the treatment of solid tumours. *Immunology* 145, 182-201.

- Zeisberg, E.M., Tarnavski, O., Zeisberg, M., Dorfman, A.L., McMullen, J.R., Gustafsson, E., Chandraker, A., Yuan, X., Pu, W.T., Roberts, A.B., et al. (2007). Endothelial-to-mesenchymal transition contributes to cardiac fibrosis. *Nat Med* 13, 952-961.
- Zeisberg, M., Shah, A.A., and Kalluri, R. (2005). Bone morphogenic protein-7 induces mesenchymal to epithelial transition in adult renal fibroblasts and facilitates regeneration of injured kidney. *The Journal of biological chemistry* 280, 8094-8100.
- Zeitlmann, L., Knorr, T., Knoll, M., Romeo, C., Sirim, P., and Kolanus, W. (1998). T cell activation induced by novel gain-of-function mutants of Syk and ZAP-70. *The Journal of biological chemistry* 273, 15445-15452.
- Zerp, S.F., van Elsas, A., Peltenburg, L.T., and Schrier, P.I. (1999). p53 mutations in human cutaneous melanoma correlate with sun exposure but are not always involved in melanomagenesis. *British journal of cancer* 79, 921-926.
- Zhang, H., Wong, C.C., Wei, H., Gilkes, D.M., Korangath, P., Chaturvedi, P., Schito, L., Chen, J., Krishnamachary, B., Winnard, P.T., Jr., et al. (2012a). HIF-1-dependent expression of angiopoietin-like 4 and L1CAM mediates vascular metastasis of hypoxic breast cancer cells to the lungs. *Oncogene* 31, 1757-1770.
- Zhang, J., Benavente, C.A., McEvoy, J., Flores-Otero, J., Ding, L., Chen, X., Ulyanov, A., Wu, G., Wilson, M., Wang, J., et al. (2012b). A novel retinoblastoma therapy from genomic and epigenetic analyses. *Nature* 481, 329-334.
- Zhang, J., Berenstein, E., and Siraganian, R.P. (2002). Phosphorylation of Tyr342 in the linker region of Syk is critical for Fc epsilon RI signaling in mast cells. *Molecular and cellular biology* 22, 8144-8154.
- Zhang, J., Kimura, T., and Siraganian, R.P. (1998). Mutations in the activation loop tyrosines of protein tyrosine kinase Syk abrogate intracellular signaling but not kinase activity. *Journal of immunology* 161, 4366-4374.
- Zhang, K., Rodriguez-Aznar, E., Yabuta, N., Owen, R.J., Mingot, J.M., Nojima, H., Nieto, M.A., and Longmore, G.D. (2012c). Lats2 kinase potentiates Snail1 activity by promoting nuclear retention upon phosphorylation. *The EMBO journal* 31, 29-43.
- Zhang, X., Shrikhande, U., Alicie, B.M., Zhou, Q., and Geahlen, R.L. (2009). Role of the protein tyrosine kinase Syk in regulating cell-cell adhesion and motility in breast cancer cells. *Mol Cancer Res* 7, 634-644.
- Zhang, X.F., Schaefer, A.W., Burnette, D.T., Schoonderwoert, V.T., and Forscher, P. (2003). Rho-dependent contractile responses in the neuronal growth cone are independent of classical peripheral retrograde actin flow. *Neuron* 40, 931-944.
- Zhao, H., Kitaura, H., Sands, M.S., Ross, F.P., Teitelbaum, S.L., and Novack, D.V. (2005). Critical role of beta3 integrin in experimental postmenopausal osteoporosis. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 20, 2116-2123.
- Zhao, M. (2009). Electrical fields in wound healing-An overriding signal that directs cell migration. *Semin Cell Dev Biol* 20, 674-682.
- Zhao, M., Song, B., Pu, J., Wada, T., Reid, B., Tai, G., Wang, F., Guo, A., Walczysko, P., Gu, Y., et al. (2006). Electrical signals control wound healing through phosphatidylinositol-3-OH kinase-gamma and PTEN. *Nature* 442, 457-460.
- Zhen, Y., and Stenmark, H. (2015). Cellular functions of Rab GTPases at a glance. *Journal of cell science* 128, 3171-3176.
- Zheng, Y., de la Cruz, C.C., Sayles, L.C., Alleyne-Chin, C., Vaka, D., Knaak, T.D., Bigos, M., Xu, Y., Hoang, C.D., Shrager, J.B., et al. (2013). A rare population of CD24(+)ITGB4(+)Notch(hi) cells drives tumor propagation in NSCLC and requires Notch3 for self-renewal. *Cancer cell* 24, 59-74.
- Zhou, B.P., Deng, J., Xia, W., Xu, J., Li, Y.M., Gunduz, M., and Hung, M.C. (2004). Dual regulation of Snail by GSK-3beta-mediated phosphorylation in control of epithelial-mesenchymal transition. *Nat Cell Biol* 6, 931-940.
- Zhu, J., Blenis, J., and Yuan, J. (2008). Activation of PI3K/Akt and MAPK pathways regulates Myc-mediated transcription by phosphorylating and promoting the degradation of Mad1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 6584-6589.
- Zhu, J., Carman, C.V., Kim, M., Shimaoka, M., Springer, T.A., and Luo, B.H. (2007). Requirement of alpha and beta subunit transmembrane helix separation for integrin outside-in signaling. *Blood* 110, 2475-2483.
- Ziaee, S., and Chung, L.W. (2014). Induction of integrin alpha2 in a highly bone metastatic human prostate cancer cell line: roles of RANKL and AR under three-dimensional suspension culture. *Mol Cancer* 13, 208.
- Zou, W., and Chen, L. (2008). Inhibitory B7-family molecules in the tumour microenvironment. *Nat Rev Immunol* 8, 467-477.
- Zou, W., Reeve, J.L., Liu, Y., Teitelbaum, S.L., and Ross, F.P. (2008). DAP12 couples c-Fms activation to the osteoclast cytoskeleton by recruitment of Syk. *Molecular cell* 31, 422-431.

Zyss, D., Montcourrier, P., Vidal, B., Anguille, C., Merezegue, F., Sahuquet, A., Mangeat, P.H., and Coopman, P.J. (2005). The Syk tyrosine kinase localizes to the centrosomes and negatively affects mitotic progression. *Cancer research* 65, 10872-10880.

