



HAL
open science

Rôle de la phosphatase PRL-3 et de CRMP2 dans la migration et l'invasion du mélanome uvéal

Laura Duciel

► **To cite this version:**

Laura Duciel. Rôle de la phosphatase PRL-3 et de CRMP2 dans la migration et l'invasion du mélanome uvéal. Cancer. Université Paris Saclay (COMUE), 2018. Français. NNT : 2018SACLS233 . tel-02304146

HAL Id: tel-02304146

<https://theses.hal.science/tel-02304146>

Submitted on 3 Oct 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.

Rôle de la phosphatase PRL-3 et de CRMP2 dans la migration et l'invasion du mélanome uvéal

Thèse de doctorat de l'Université Paris-Saclay
Préparée à l'Université Paris-Sud

École doctorale n°577 Structure et dynamique des systèmes vivants
(SDSV)
Spécialité de doctorat: Sciences de la vie et de la santé

Thèse présentée et soutenue à Orsay, le 18 Septembre, par

Laura Duciel

Composition du Jury :

Karim Benihoud Professeur, Institut Gustave Roussy (UMR 8203)	Président
Frédéric Mouriaux Professeur d'ophtalmologie, INSERM (U1341), CHU Rennes	Rapporteur
Corine Bertolotto Directeur de recherche INSERM U1065	Rapporteur
Frédéric Mascarelli Directeur de recherche INSERM U872	Examineur
Marie-Dominique Galibert Professeur, IGDR, CHU Rennes	Examineur
Simon Saule Professeur, Institut Curie (UMR3347 / U1021)	Directeur de thèse

Table des matières

Remerciements	2
Table des matières	6
Liste des Abréviations	8
Liste des figures et Tableaux	10
<u>Introduction</u>	12
Chapitre I : Cancers et développement métastatique	14
1. Le cancer : définition	14
2. Oncogènes et gènes suppresseurs de tumeurs	14
3. Propriétés / caractéristiques des cellules cancéreuses	17
4. Les étapes conduisant à la métastase	19
Invasion locale	21
Plasticité morphologique des cellules tumorales	26
Interaction entre le réseau d'actine et de microtubules au cours de la migration cellulaire	27
Intravasation et survie dans la circulation sanguine.....	29
Extravasation et formation de métastases	30
Co-option sur les vaisseaux	31
Chapitre II : L'œil et le mélanome uvéal	34
1. Anatomie de l'œil	34
2. Les mélanocytes	35
Origine embryonnaire des mélanocytes.....	35
Rôle des mélanocytes	38
Pathologies associées aux mélanocytes uvéaux.....	39
3. Le mélanome uvéal	40
Généralités	40
Epidémiologie	40
Prédispositions et facteurs de risque	41
Symptômes et Diagnostic	41
Facteurs pronostiques	43
Traitement de la tumeur primaire.....	43
Evolution métastatique	45
Anomalies chromosomiques	45
Classification des tumeurs	48
Altérations des mécanismes moléculaires	49
Mutations perte de fonction de BAP1	53
Mutations de SF3B1.....	53
Mutations de EIF1AX	54

Expression de l'antigène PRAME	54
Nouvelle classification des tumeurs en 4 sous-groupes	55
Développement de thérapies pour les métastases du mélanome uvéal	57
Chapitre III : La phosphatase PRL-3 et cancers.....	64
1. La famille des PRLs	64
Caractéristiques des PRLs	64
Structure des PRLs	65
Fonctions physiologiques des PRLs.....	66
Expressions normales et pathologiques des PRLs	66
2. PRL-3 dans les cancers.....	69
Expression de PRL-3 dans les cancers.....	69
Voies de signalisation médiées par PRL-3.....	70
Régulation de PRL-3.....	73
Inhibition de PRL-3.....	76
Chapitre IV : Les CRMPs	80
1. La famille des CRMPs	80
Caractéristiques des CRMPs	80
Structure des CRMPs	81
Fonctions physiologiques des CRMPs.....	85
Régulations des CRMPs	90
Expressions des CRMPs	94
Traitements ciblant CRMP2	96
Résultats.....	98
Objectif des travaux de recherche.....	100
Partie I : Rôle de la phosphatase PRL-3/PTP4A3 et de CRMP2 dans la migration et l'invasion du mélanome uvéal	102
Partie II : La phosphatase PRL-3 est un acteur central des étapes clés de la tumorigenèse et du développement métastatique.....	103
Discussion.....	111
Bibliographie	121

Liste des Abréviations

NK : Cellule tueuse naturelle (Natural killer)

TEM : Transition épithélio-mésenchymateuse

MEC : Matrice extracellulaire

CTCs : Cellules tumorales circulantes

EVMM : Extravascular migratory metastasis

CN : Crête neurale

CCN : Cellule de crête neurale

COMS : Collaborative Ocular Melanoma Study Group

PRLs : Phosphatase of regenerating liver

PTP : Protein tyrosin phosphatase

IncARN : Long ARN non codant

DHPase : Dihydropyrimidinas

FISH : Fluorescent In Situ Hybridization

CGH : Comparative genomic hybridization

MAP : Microtubule associated protein

LPA : Lysophosphatidic acid

CRMPs : Collapsin response mediated protein

DPSYSL : dihydropyrimidinase like

TOAD : Turned on after divison

Liste des figures et Tableaux

Chapitre I :

Figure I.1 : Les gènes associés au développement tumoral et voies de signalisation associées.

Figure I.2 : Propriétés des cellules cancéreuses proposées par Hanahan et Weinberg.

Figure I.3 : Les différentes étapes conduisant à la formation de métastases.

Figure I.4: Modèle en 5 étapes de la migration cellulaire en 3D.

Figure I.5: Mécanisme de plasticité de l'invasion tumorale.

Figure I.6 : Interaction entre le réseau d'actine et de microtubules au cours de la migration cellulaire.

Figure I.7 : Le mécanisme d'EVMM.

Tableau I.1 : Classification des gènes différentiellement exprimés dans les cellules de mélanomes angiotropiques.

Chapitre II :

Figure II.1 : Schéma d'une coupe sagittale de l'œil.

Figure II.2: Induction de la bordure et neurulation.

Tableau II.1 : Types cellulaires et tissus dérivés des cellules de la crête neurale.

Figure II.3: Le mélanome uvéal.

Figure II.4: Courbes de survie Kaplan-Meier selon les statuts des chromosomes 3, 8 et 6.

Figure II.5: Les anomalies chromosomiques du mélanome uvéal.

Figure II.6 : Profils d'expression des 12 gènes permettant la prédiction métastatique dans le mélanome uvéal.

Figure II.7: Voies de signalisation impliquées dans le mélanome uvéal.

Figure II.8 : Modèle de progression de la tumorigenèse du mélanome uvéal.

Figure II.9 : Séparation des deux classes de tumeurs en deux sous-groupes distincts.

Tableau II.2 : Traitement adjuvant actuellement en essais clinique contre le mélanome uvéal.

Tableau II.3 : Traitement actuellement en essais clinique contre les métastases du mélanome uvéal.

Chapitre 3 :

Figure III.1 : Caractéristiques des PRLs.

Figure III.2 : Les acteurs et voies de signalisation majeurs régulés par PRL-3 dans les différents processus clés du développement tumoral et métastatique.

Figure III.3 : Régulation de l'accumulation de PRL-3.

Chapitre IV :

Tableau IV.1 : Nomenclature des CRMPs.

Figure IV.1 : Structure cristallographique de CRMP2.

Figure IV.2 : Oligomérisation des CRMPs.

Figure IV.3 : Représentation schématique d'un neurone et de la composition des éléments du cytosquelette dans le cône de croissance.

Figure IV.6 : Rôle de CRMP2 dans les neurones.

Figure IV.7 : Caractérisation des deux isoformes des CRMPs.

Figure IV.8 : Schéma des sites de phosphorylation de CRMP2.

Résultats :

Figure V.1 : Implication de PRL-3 dans la migration et l'invasion des cellules de mélanome uvéal.

Figure V.2 : Architecture générale de l'environnement de NaviCell.

Figure V.3 : Construction d'une carte avec Celldesigner.

Figure V.4 : L'interface d'ACSN.

Figure V.5 : Carte des molécules et voies de signalisation régulées par PRL-3 dans les cancers.

Introduction

Chapitre I : Cancers et développement métastatique

1. Le cancer : définition

Le cancer est une maladie caractérisée par une prolifération cellulaire incontrôlée dans un organe donné. Cette capacité à proliférer est liée à un échappement des cellules aux mécanismes de régulation qui assurent le développement normal de l'organisme. Les cellules cancéreuses donnent naissance à des tumeurs qui envahissent puis détruisent les zones qui les entourent, elles peuvent également essaimer à distance pour former une nouvelle tumeur (métastase) menaçant ainsi la survie de l'individu.

Il existe plus d'une centaine de type de cancers différents qui se distinguent en fonction de l'origine du tissu mais également par leur comportement et leur réponse aux traitements. Les carcinomes proviennent d'un épithélium, les sarcomes des tissus conjonctifs, les mélanomes des mélanocytes et les cancers hématopoïétiques proviennent des cellules sanguines. On distingue dans la pathologie du cancer les tumeurs bénignes et malignes. A l'inverse d'une tumeur bénigne, une tumeur maligne est capable d'envahir les tissus normaux avoisinants et de se répandre à travers l'organisme à des endroits distants via le système sanguins ou lymphatique formant ainsi une métastase. Seules les tumeurs malignes sont désignées comme des cancers.

Le mécanisme à l'origine du passage d'une cellule saine à une cellule cancéreuse est appelé la transformation cellulaire. La transformation est, en général, un processus lent et progressif, dû à l'accumulation d'altérations génétiques et/ou de dérégulations de l'expression génique. Ces altérations vont permettre aux cellules transformées d'acquérir des propriétés pour permettre le développement de la tumeur.

2. Oncogènes et gènes suppresseurs de tumeurs

La première étape de la transformation correspond à une prolifération cellulaire accrue via la dérégulation de l'expression génique. C'est au début des années 80 que les chercheurs ont établi deux catégories de gènes impliquées dans le développement du cancer : les oncogènes et les gènes suppresseurs de tumeurs [1], [2]. Ces études ont également permis de montrer, d'une part la complexité des origines mutationnelles du cancer avec des oncogènes et des gènes suppresseurs de tumeurs qui varient d'une tumeur à l'autre et en fonction du type de tumeur, et d'autre part la multitude de gènes qui contribuent à la tumorigenèse [3].

Les oncogènes sont des gènes qui sont normalement impliqués dans la division cellulaire. Lorsqu'ils sont mutés ou qu'il y a une augmentation du nombre de copies dans le génome, les produits de ces gènes ont une activité anormalement accrue qui conduit à une prolifération cellulaire anormale et peut ainsi amener au développement d'un cancer. Au contraire, les gènes suppresseurs de tumeur sont des freins à la croissance et à la division cellulaire, et sont souvent impliqués dans la réparation de l'ADN ou l'apoptose. C'est donc l'inactivation des gènes suppresseurs de tumeurs qui mène au développement d'un cancer.

Bien qu'il existe une multitude de gènes impliqués dans le développement tumoral, certains d'entre eux sont retrouvés de façon récurrente dans de nombreux cancers. Par exemple, l'inactivation d'au moins une protéine impliquée dans le blocage en phase G1 du cycle cellulaire, telle que Rb et p16 (CDKN2a), est retrouvée dans la plupart des cancers. On retrouve également dans quasiment tous les cancers des mutations inactivatrices de protéines telles que p53 qui sont essentielles dans le contrôle des points de passage du cycle cellulaire et qui sont capables d'arrêter le cycle si une étape précédente ne s'est pas faite correctement. De même, une protéine Ras constitutivement active est retrouvée dans plusieurs cancers de différentes origines [4]. Au contraire certains gènes sont plus spécifiques à un type de cancer, la mutation des gènes BRCA1 et BRCA2 est par exemple associée essentiellement aux cancers du sein et des ovaires [5].

Tous les gènes associés au développement tumoral peuvent être classés selon 12 voies de signalisation (**Figure I.1A**) qui peuvent elles-mêmes être organisées en trois processus cellulaires [6]:

- La destinée cellulaire : la différenciation cellulaire s'oppose à la division cellulaire, de nombreuses altérations génétiques dans les cancers favorisent la division à la différenciation ce qui confère un avantage prolifératif sélectif à la cellule.
- La survie cellulaire : Les cellules cancéreuses acquièrent une capacité accrue à proliférer grâce notamment à la mutation des gènes EGFR, HER2, FGFR2, PDGFR, TGF β R2, MET, KIT, RAS, RAF, PIK3CA et PTEN. Certains de ces gènes codent pour des récepteurs aux facteurs de croissance, d'autres sont des relayers du signal en aval. Les gènes CDKN2a, MYC et BCL2 qui contrôlent la progression du cycle cellulaire et l'apoptose sont également souvent mutés (de façon inhibitrice ou activatrice) dans les cancers.
- La maintenance du génome : Dans les cellules normales, les cellules ayant des anomalies génétiques sont éliminées par apoptose. Dans les cellules cancéreuses des mutations des gènes tels que TP53, ATM, MLH1 et MSH2 permettent la survie des cellules endommagées et leur donnent également un avantage prolifératif.

La liste des gènes impliqués dans les cancers associés au processus cellulaire altéré est présentée en **Figure I.1B**.

A



B Table 2. Discoveries from Cancer Genome Characterization

Cellular Process Altered by Genomic Alterations	Examples of Cancer Genes Discovered (or Extended to New Cancers*) by Genomics
RTK signaling	<i>EGFR</i> ^a , <i>ERBB2</i> ^{,a} , <i>MET</i> ^{,a,b} , <i>ALK</i> ^{,a} , <i>JAK2</i> ^{,a} , <i>RET</i> ^{,a} , <i>ROS</i> ^{,a} , <i>FGFR1</i> ^{,a} , <i>FGFR2</i> ^{,a} , <i>PDGFRA</i> ^{,a} and <i>CRKL</i> ^a
MAPK signaling (oncogenes)	<i>KRAS</i> ^{,a} , <i>NRAS</i> ^{,a} , <i>BRAF</i> ^{,a} and <i>MAP2K1</i> ^a
MAPK signaling (TSG)	<i>NF1</i> ^{,b}
PI3K signaling (oncogenes)	<i>PIK3CA</i> ^{,a} , <i>AKT1</i> ^{,a} and <i>AKT3</i> ^a
PI3K signaling (TSG)	<i>PTEN</i> ^{,b} and <i>PIK3R1</i> ^b
Notch signaling (oncogene or TSG)	<i>NOTCH1</i> ^{,c} , <i>NOTCH2</i> ^{,c} and <i>NOTCH3</i> ^b
TOR signaling (TSG)	<i>STK11</i> ^{,a,b} , <i>TSC1</i> ^{,a,b} and <i>TSC2</i> ^{,a,b}
Wnt/ β -catenin signaling (TSG)	<i>APC</i> ^{,b} and <i>CTNNB1</i> ^{,a}
TGF- β signaling (TSG)	<i>SMAD2</i> ^{,a,b} , <i>SMAD4</i> ^{,a,b} and <i>TGFBR2</i> ^b
NF- κ B signaling (oncogene)	<i>MYD88</i> ^a
Other signaling	<i>RAC1</i> ^{,a} , <i>RAC2</i> ^{,a} , <i>CDC42</i> ^{,a} , <i>KEAP1</i> ^{,b} , <i>MAP3K1</i> ^{,b} , <i>MAP2K4</i> ^{,b} , <i>ROBO1</i> ^{,b} , <i>ROBO2</i> ^{,b} , <i>SLIT2</i> ^{,b} , <i>SEMA3A</i> ^{,b} , <i>SEMA3E</i> ^{,b} , <i>ELMO1</i> ^{,d} and <i>DOCK2</i> ^d
Epigenetics DNA methylation	<i>DNMT3A</i> ^b
Epigenetics DNA hydroxymethylation	<i>TET2</i> ^b
Chromatin histone methyltransferases	<i>MLL</i> ^{,a,b} , <i>MLL2</i> ^{,b} , <i>MLL3</i> ^{,b} , <i>EZH2</i> ^{,c} , <i>NSD1</i> ^{,b} and <i>NSD3</i> ^b
Chromatin histone demethylases	<i>JARID1A</i> ^{,b} , <i>UTX</i> ^{,b} , <i>KDM5A</i> ^{,b} and <i>KDM5C</i> ^b
Chromatin histone acetyltransferases	<i>CREBP</i> ^{,b} and <i>EP300</i> ^b
Chromatin SWI/SNF complex	<i>SMARCA1</i> ^{,a,b} , <i>SMARCA4</i> ^{,b} , <i>ARID1A</i> ^{,b} , <i>ARID2</i> ^{,b} , <i>ARID1B</i> ^{,b} and <i>PBRM1</i> ^b
Chromatin other	<i>CHD1</i> ^{,b} , <i>CHD2</i> ^{,b} and <i>CHD4</i> ^b
Transcription factor lineage dependency or oncogene	<i>MITF</i> ^{,a} , <i>NKX2-1</i> ^{,a} , <i>SOX-2</i> ^{,a} , <i>ERG</i> ^{,a} , <i>ETV1</i> ^{,a} and <i>CDX2</i> ^a
Transcription factor other	<i>MYC</i> ^{,a} , <i>RUNX1</i> ^{,b} , <i>GATA3</i> ^{,b} , <i>FOXA1</i> ^{,b} , <i>NKX3.1</i> ^{,b} , <i>SOX9</i> ^{,a} , <i>NFE2L2</i> ^{,a} and <i>MED12</i> ^d
Splicing	<i>SF3B1</i> ^{,d} , <i>U2AF1</i> ^{,d} , <i>SFRS1</i> ^{,d} , <i>SFRS7</i> ^{,d} , <i>SF3A1</i> ^{,d} , <i>ZRSR2</i> ^{,b} , <i>SRSF2</i> ^{,d} , <i>U2AF2</i> ^{,d} and <i>PRPF40B</i> ^d
RNA abundance	<i>DIS3</i> ^d
Translation/protein homeostasis/ubiquitination	<i>SPOP</i> ^{,d} , <i>FBXW7</i> ^{,a,b} , <i>WWP1</i> ^{,a,b} , <i>FAM46C</i> ^{,d} and <i>XBP1</i> ^d
Metabolism	<i>IDH1</i> ^a and <i>IDH2</i> ^{,a}
Genome integrity	<i>TP53</i> ^{,a,b} , <i>MDM2</i> ^{,a} , <i>MSH</i> ^{,a,b} , <i>MLH</i> ^{,a,b} and <i>ATM</i> ^{,a,b}
Telomere stability	<i>TERT</i> promoter mutations ^a
Cell cycle (oncogene)	<i>CCND1</i> ^{,a} and <i>CCNE1</i> ^{,a}
Cell cycle (TSG)	<i>CDKN2A</i> ^{,a,b} , <i>CDKN2B</i> ^{,a,b} and <i>CDKN1B</i> ^b
Apoptosis regulation	<i>MCL1</i> ^{,a} , <i>BCL2A1</i> ^{,a} and <i>BCL2L1</i> ^a

Figure I.1 : Les gènes associés au développement tumoral et voies de signalisation associées.

A Les gènes associés au développement tumoral sont classés selon 12 voies de signalisation qui confèrent aux cellules un avantage sélectif de croissance. Ces voies sont elles-mêmes réparties en trois processus cellulaires.

B Liste des gènes associés au développement tumoral et processus cellulaires affectés par ces gènes.

Les études génomiques ont permis d'identifier de nombreux gènes impliqués dans le développement tumoral. Certains affectent les voies de signalisation précédemment décrites : la prolifération, la différenciation, la survie et la maintenance du génome. Tandis que certains affectent également d'autres processus cellulaires tels que : le métabolisme, l'épigénétique, la chromatine et l'épissage.

a : Mutation activatrice ou amplification

b : Mutation inactivatrice ou délétion

c : Evènements d'activation ou d'inhibition observés

d : Effet de la mutation sur la fonction protéique non connu

Figure et légende d'après (Vogelstein et al., 2013) et (Garraway et Lander., 2013).

3. Propriétés / caractéristiques des cellules cancéreuses

Les cellules cancéreuses se distinguent des cellules saines par six capacités biologiques essentielles, distinctes et complémentaires, acquises au cours de la transformation cellulaire [7]. Ces six capacités sont également accompagnées de l'acquisition de quatre caractéristiques générales favorisant le développement tumoral (**Figure I.2**).

L'ensemble de ces capacités (capacités biologiques essentielles et caractéristiques générales) sont :

1. **Autosuffisance en facteurs de croissance** : par activation constitutive des voies de signalisation impliquées dans la prolifération cellulaire.
2. **Insensibilité à la signalisation antiproliférative** : par inactivation de gènes suppresseurs de tumeurs impliqués dans la régulation négative de la prolifération cellulaire tels que Rb et p53.
3. **Résistance aux mécanismes de mort cellulaire** : par inhibition des gènes pro-apoptotiques ou surexpression des régulateurs anti-apoptotiques (ex: famille Bcl-2). Comme décrit précédemment, le gène TP53, régulateur majeur du cycle et de l'apoptose, est muté dans 50% des tumeurs.
4. **Sénescence répllicative et mécanismes d'échappement** : en déjouant le mécanisme de raccourcissement des télomères. Cela se fait soit par réactivation de l'expression de la télomérase ou bien par un mécanisme de recombinaison inter-télomérique.
5. **Induction à l'angiogenèse** : signalisation oncogénique assurant la néovascularisation de la tumeur pour permettre l'approvisionnement en nutriments et oxygène ainsi que l'élimination des déchets.
6. **Instabilité génomique et mutabilité** : L'acquisition des caractéristiques précédemment décrites dépend largement d'une altération du génome telle que des réarrangements chromosomiques, des amplifications géniques et/ou une accumulation de mutations. Cette instabilité génomique passe par l'inhibition de la machinerie de réparation de l'ADN augmentant ainsi la mutabilité des cellules cancéreuses.

7. **Promotion de l'inflammation par la tumeur** : La présence de cellules du système immunitaire dans les tumeurs provoquant ainsi une inflammation joue un rôle paradoxal dans la promotion de la tumorigenèse. En effet, l'inflammation est d'abord due à une tentative du système immunitaire d'éradiquer la tumeur. Néanmoins, les cellules tumorales peuvent, de par leurs propriétés acquises, non seulement échapper au système immunitaire mais également le détourner afin de permettre l'approvisionnement du microenvironnement tumoral notamment en facteurs de croissance, facteurs de survie et facteurs angiogéniques. Elles peuvent également permettre la libération de molécules de types dérivés de réactifs de l'oxygène qui sont hautement mutagènes.
8. **Résistance à la destruction par les acteurs du système immunitaire** : les cellules cancéreuses échappent à la destruction par le système immunitaire via plusieurs mécanismes tels que l'inhibition de l'infiltration des LTC ou des cellules tueuses naturelles (NKs) en sécrétant des facteurs immunosuppresseurs (ex : TGF- β) [8].
9. **Reprogrammation du métabolisme énergétique** : Le métabolisme des cellules cancéreuses décrit par Otto Warburg dans les années 1930 est devenu une marque spécifique associée au cancer, appelée « effet Warburg ». En effet, il a observé que les cellules cancéreuses limitent leur métabolisme énergétique à la glycolyse en présence ou en absence d'oxygène. Paradoxalement, ce phénomène qui s'appelle la « glycolyse anaérobie » produit beaucoup moins d'ATP comparé à la phosphorylation oxydative mais cela peut s'expliquer par le fait que la glycolyse anaérobie permet de satisfaire la demande en dérivés glycosylés nécessaires à une prolifération cellulaire rapide [9]. De plus, pour compenser le manque d'ATP, les cellules cancéreuses ont une captation de glucose accrue en surexprimant certains transporteurs de glucose comme GLUT1 [10].
10. **Invasion et métastases** : Le stade métastatique est le dernier stade de l'oncogenèse. Le cancer métastatique est le plus agressif et le plus menaçant pour la vie de l'individu. La formation de métastases résulte de la migration des cellules tumorales du site de la tumeur primaire à un site distant. Ce processus est souvent dû une transition épithélio-mésenchymateuse (TEM), un phénomène cellulaire impliqué dans le développement embryonnaire ou la cicatrisation, qui est détourné par les cellules tumorales à leur avantage pour envahir les tissus distants [11]. Un ensemble de facteurs de transcription tels que Snail, Slug, Twist et Zeb1/2 orchestre cette TEM et le pouvoir migratoire des cellules qui y est associé. Au niveau du site métastatique, les cellules disséminées reforment une masse tumorale et peuvent subsister dans un état non invasif. Les cellules ayant subi une TEM peuvent entamer une transition inverse, c'est-à-dire une transition mésenchymato-épithéliale. Enfin, dans ce nouveau microenvironnement largement différent de celui du site primaire, les cellules cancéreuses doivent d'abord survivre, s'adapter et former des micrométastases ou alternativement subsister sous forme de cellules dormantes. Cette partie sera détaillée dans la partie suivante traitant de la métastase.

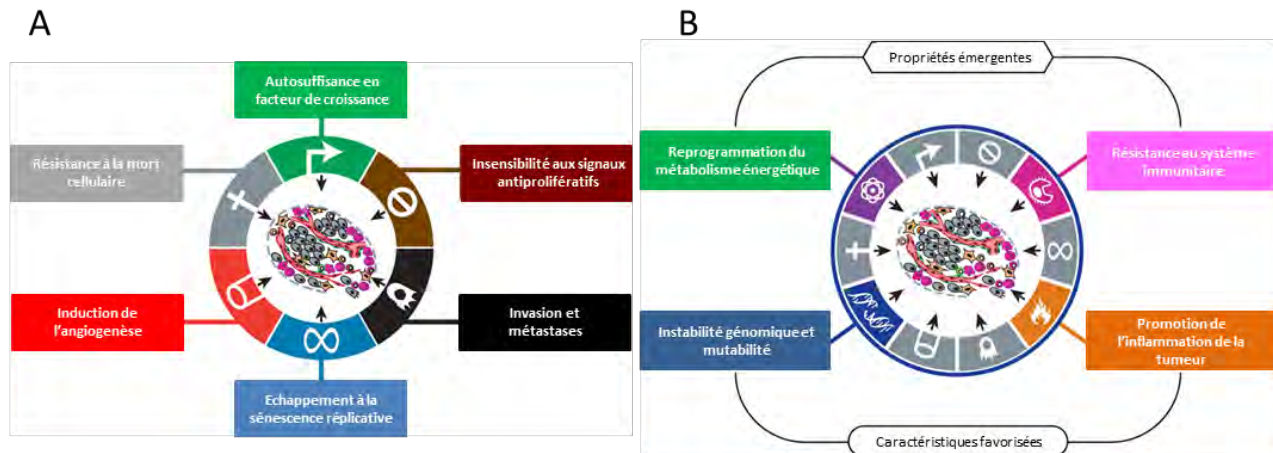


Figure I.2 : Propriétés des cellules cancéreuses proposées par Hanahan et Weinberg.

A Les 6 propriétés acquises des cellules cancéreuses.

B Les 4 propriétés émergentes des cellules cancéreuses.

Figure et légende d'après (Hanahan et Weinberg., 2011).

4. Les étapes conduisant à la métastase

Le développement métastatique résulte de la dissémination de cellules cancéreuses du site primaire de la tumeur à des organes distants. Bien que certaines tumeurs primaires puissent être traitées par résection chirurgicale ou une thérapie par adjuvants, les métastases sont parfois difficiles à traiter à cause de leur nombre, leur localisation, et leur résistance aux thérapies existantes. Elles sont ainsi responsables de plus de 90% de la mortalité liée au cancer.

Comme précédemment décrit, la formation de métastases représente la dernière étape d'une cascade d'évènements cellulaires qui comprend les étapes suivantes (**Figure I.3**) [12], [13]:

- Les étapes de la tumeur primaire : angiogenèse et prolifération, perte d'adhérence et capacité de mobilité et de diffusion
- Les étapes dans la circulation : entrée, survie et transport
- Les étapes dans les organes distants : arrêt dans le tissu, extravasation, prolifération et angiogenèse qui marque l'installation de la métastase

L'ensemble de ces étapes sont séquentielles, évolutives et liées les unes aux autres [14].

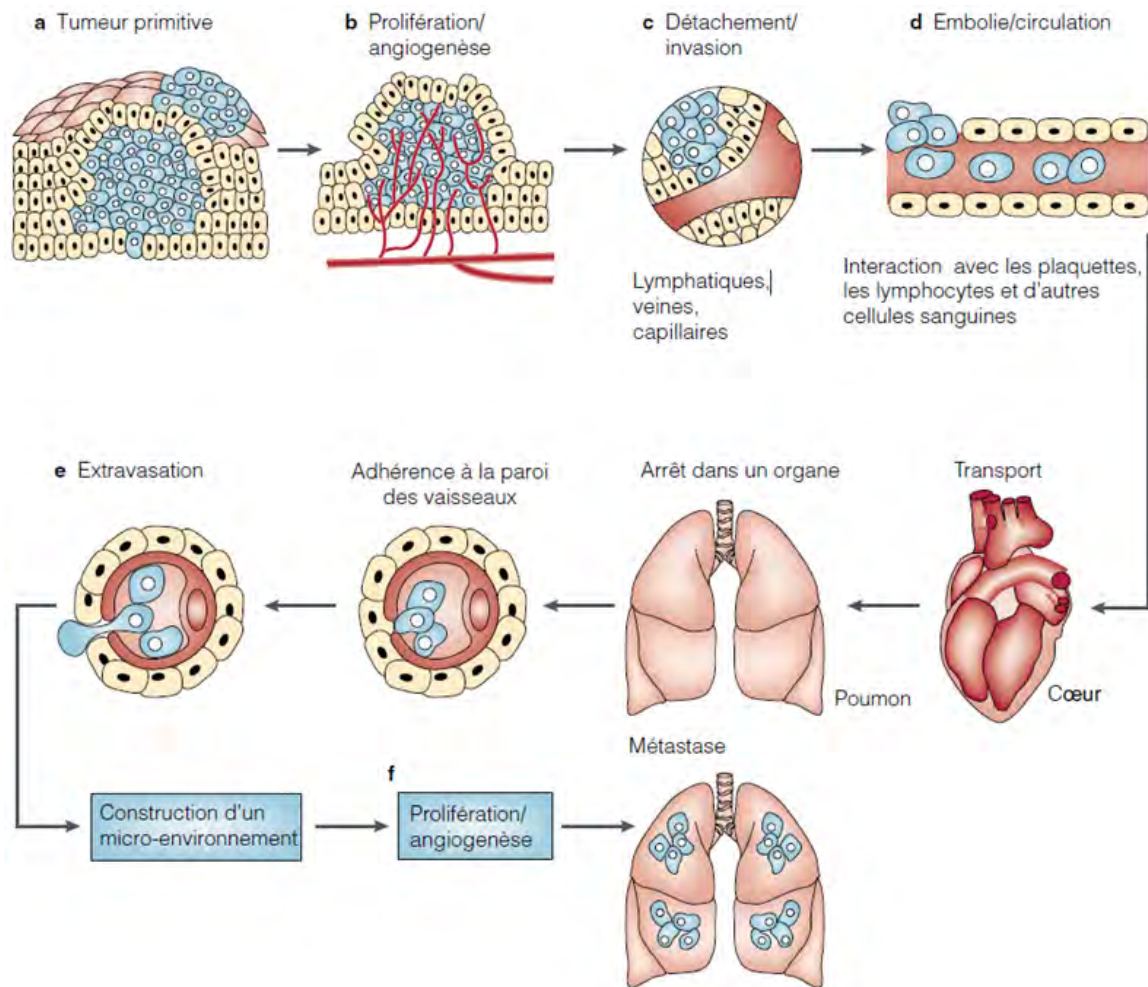


Figure I.3 : Les différentes étapes conduisant à la formation de métastases.

a Transformation cellulaire et croissance tumorale.

b Prolifération de la tumeur primaire et angiogenèse.

c Invasion locale du stroma.

d Détachement d'une cellule ou d'un groupe de cellules tumorales de la tumeur primaire et intravasation pour rejoindre la circulation sanguine ou lymphatique.

e Adhérence à la paroi d'un vaisseau sanguin ou lymphatique et extravasation.

f Prolifération et angiogenèse dans l'organe distant et formation de métastases.

Figure et légende d'après (Fidler., 2003).

Bien que la dissémination des cellules cancéreuses par circulation dans les vaisseaux soit établi comme paradigme central, un autre mécanisme de dissémination a également été mis en évidence dans lequel les cellules cancéreuses ne circulent pas dans les vaisseaux mais migrent le long de ceux-ci pour se propager. Ce mécanisme sera détaillé plus loin.

La dissémination des cellules cancéreuses, à l'intérieur des vaisseaux, se fait selon deux voies principales :

La première voie est la voie lymphatique : les cellules cancéreuses quittent la tumeur d'origine via les capillaires lymphatiques, qui drainent l'organe siège de la tumeur primaire et qui se rassemblent au niveau des ganglions lymphatiques ce qui conduit à une invasion de ces derniers. Il s'agit alors d'une invasion métastatique de voisinage dont le pronostic est plus favorable étant donné que les ganglions lymphatiques sont chirurgicalement accessibles lors de l'exérèse de la tumeur, et qu'ils exercent une filtration mécanique et un contrôle immunologique sur les cellules en cours de dissémination.

La deuxième voie est la voie sanguine, conduisant à l'invasion d'organes à distance comme le poumon, le foie, le cerveau, ou les os. Les organes de l'appareil digestif (estomac, intestin, pancréas) sont drainés en premier lieu par le foie, par l'intermédiaire de la veine porte, ce qui pourrait expliquer le fait que les cellules cancéreuses issues de ces tissus métastasent essentiellement dans le foie. Pour le reste de l'organisme, le poumon représente le premier organe où peuvent être piégées les cellules tumorales et constituerait donc un site fréquent de métastases. Plus rarement, la propagation se fait par contact avec une cavité au niveau de laquelle les cellules cancéreuses s'implantent sur une membrane comme le péritoine ou la plèvre. Cependant, ces considérations anatomiques ne suffisent pas à expliquer pourquoi certains cancers, comme le cancer de la prostate, ont une affinité particulière pour l'os, ou le cancer du poumon pour le cerveau. Alors que les carcinomes se propagent par les deux voies, lymphatique et sanguine, les sarcomes se propagent surtout par voie sanguine, rarement par voie lymphatique. Il semblerait donc que certains facteurs liés aux propriétés des cellules tumorales mais aussi au microenvironnement métastatique gouvernent le choix de la voie de dissémination empruntée et du site d'implantation et de développement de métastases.

La spécificité des métastases pour certains organes montre que le processus métastatique n'est pas un phénomène passif mais une somme d'événements initiés par les cellules cancéreuses et dépend de multiples interactions entre les cellules potentiellement métastatiques et le microenvironnement local qui est favorable et compatible à leur implantation. Stephen Paget a été le premier, en 1889, à proposer cette théorie sur les métastases, appelé «de la graine et du sol » où la graine correspond à la cellule cancéreuse et le sol à l'organe dans lequel va se former la métastase. Le processus métastatique dépend donc à la fois des propriétés intrinsèques de la cellule tumorale et des réponses des cellules hôtes [15].

Invasion locale

L'invasion locale correspond à l'entrée des cellules cancéreuses, présentes au sein de la tumeur primaire, dans le stroma associé à la tumeur puis dans le tissu normal adjacent. Pour cela, dans la plupart des cas, les cellules tumorales acquièrent des propriétés invasives et migratoires caractéristiques de cellules mésenchymateuses. L'acquisition de ces propriétés des cellules cancéreuses s'appelle la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM).

La transition épithélio-mésenchymateuse

Bien que la TEM a été montré comme étant impliqué dans la progression tumorale et métastatique, il s'agit d'un processus normal requis au cours de développement embryonnaire pour la formation de tissus et d'organes.

La TEM est composé de plusieurs étapes au cours desquelles les cellules perdent les caractéristiques spécifiques épithéliales, qui leur permettent de rester jointes et de former ainsi l'épithélium, et développent des caractéristiques mésenchymateuses. Tout d'abord, on observe une perte des structures d'adhérence cellule-cellule due à une répression de l'expression des gènes tels que la E-cadhérine, impliqué dans la formation des jonctions adhérentes. De nombreuses voies de signalisation oncogéniques telles que (TGF)- β , Wnt et Notch induisent la TEM en activant des répresseurs transcriptionnels de la E-cadhérine tels que Snail, Slug, Zeb1/2, E47 et Twist.

La perte de l'expression de l'E-cadhérine coïncide avec la surexpression de gènes spécifiques du caractère mésenchymateux des cellules tels que la vimentine et la fibronectine.

La rupture des jonctions adhérentes dépendantes de la E-cadhérine induit une perte de polarité des cellules épithéliales ainsi que la libération dans le cytoplasme des protéines contenues dans ces jonctions, telles que la β -caténine. En plus de son rôle dans l'assemblage des complexes d'adhérence, la β -caténine joue aussi un rôle important dans la voie de signalisation canonique Wnt. Après désassemblage des complexes d'adhérence, les molécules de β -caténine sont capables d'induire l'expression de gènes cibles impliqués dans la prolifération, la transformation et la progression tumorale (c-Myc, Cycline D1-D2, MMP7 et autres) [16], [17].

Les cellules subissent également des réarrangements du cytosquelette pour finalement acquérir un phénotype migratoire et invasif. En effet, le désassemblage des jonctions adhérentes libère également la protéine p120-caténine dans le cytoplasme où elle réprime l'activité de RhoA et active celle de Rac et Cdc42, interférant, par conséquent, avec la polymérisation des fibres de stress et avec la formation des protrusions membranaires [18], [19].

Migration cellulaire des cellules de la tumeur primaire

De même que la TEM, la migration cellulaire est un processus normal et fondamental dans le développement embryonnaire qui permet la mise en place des tissus et des organes. Les cellules migrent de manière collective au cours de la gastrulation pour former les trois feuilletts embryonnaires et dessiner les grands axes d'organisation de l'organisme. Chez l'adulte, les migrations cellulaires sont moins répandues, mais néanmoins essentielle au processus de maintien de l'intégrité de l'organisme comme l'immunité, l'inflammation et la cicatrisation. Les cellules cancéreuses utilisent des mécanismes de migration similaires voire identiques à ceux des cellules saines au cours de ces processus biologiques.

Pour migrer, la forme et la dureté du corps cellulaire doivent être modifiées pour pouvoir adhérer à la matrice extracellulaire (MEC). Les cellules subissent donc un cycle continu constitué de 5 étapes interdépendantes (**Figure I.4**) [20]:

- 1- Formation de protrusion au niveau du front de migration :** la cellule s'allonge et se polarise avec un front et un arrière distincts. Un pseudopode se forme via l'extension du front de migration qui s'attache au substrat dans la MEC. La propulsion initiale et l'élongation des pseudopodes sont assurées par la polymérisation de l'actine et son assemblage en filaments. Les filaments d'actine s'associent au complexe de nucléation Arp2/3 [21] et WASP (Wiscott-Aldrich syndrome protein) [22]. Le complexe Arp2/3/WASP s'ancre à la membrane en formant des clusters avec les

phosphoinositides (PIPs) [22]. Ainsi, l'élongation de l'actine permet de pousser la membrane vers l'extérieur et induire la formation de protrusions. Les PIPs actives les GEFs (Guanine-nucleotides exchange factors) qui régulent l'activité des petites GTPases Rac, CDC42, Rho et Ras [23]. Ces protéines jouent un rôle important dans la dynamique du cytosquelette d'actine et interviennent respectivement dans la formation des lamellipodes, filopodes et fibres de stress [22], [24]. En plus du réseau d'actine, la formation de protrusions et la dynamique des lamellipodes sont également modulées par le réseau de microtubules.

- 2- **Adhérence et formation de contacts focaux** : Suite à la formation des protrusions, les protéines d'adhérence vont entrer en contact avec la MEC et initier une adhérence jusque-là peu ou pas requise. Cette adhérence est assurée par des molécules appartenant majoritairement à la famille des intégrines. Les intégrines entrent en contact avec les ligands de la MEC et forment des « clusters » à la membrane pour former un contact focal (ou plaque d'adhérence focale) [25]. Les intégrines interagissent ensuite directement avec des protéines telles que α -actinine, la taline et la kinase FAK (focal adhesion kinase) [26]. Ces protéines vont ensuite s'associer à des protéines adaptatrices pour recruter des protéines associées aux filaments d'actine comme la vinculine et la paxilline et induire des signaux de phosphorylation et déphosphorylation activant ainsi des voies de signalisation intracellulaires telles que PI3K, protéine kinase C (PKC) et Rho GTPases [27], [28]. Elles activent aussi des kinases qui phosphorylent des protéines du cytosquelette et régulent ainsi la formation des fibres de stress, la morphologie cellulaire et la migration.
- 3- **Recrutement de protéases aux foyers focaux et protéolyse focale** : Pour migrer, les cellules doivent dégrader et remodeler les composants de la MEC (collagène IV, laminine, entactine et protéoglycanes) qui constituent une barrière à la dissémination tumorale. La dégradation nécessite le recrutement de protéases au front de migration et leur sécrétion dans l'environnement extracellulaire où elles clivent de façon spécifique les composants de la MEC [29]. Les protéases recrutées au niveau des points d'adhérence sont entre autres des métalloprotéases (MMPs), des sérines protéases ou la famille des désintégrines et métalloprotéases ADAMs [30], [31]. Les collagénases clivent le collagène et d'autres macromolécules de la MEC en plus petits fragments qui sont à leur tour dégradés par les gélatinases ou les sérines protéases.
- 4- **Contraction cellulaire par l'actomyosine** : L'adhérence cellulaire de la MEC a deux fonctions dans la cellule, elle génère des forces de traction en liant un substrat de la MEC au réseau d'actomyosine et induit la signalisation qui régule la migration et la survie des cellules. Une cellule adhérente s'allonge et assemble son réseau d'actine sous l'action de protéines de liaison telles que l' α -actinine ou la myosine II. Le réseau d'actine sous le feuillet interne de la membrane plasmique est appelé actine corticale alors que les filaments d'actine au centre de la cellule sont appelés fibres de stress. La myosine II active s'associe aux filaments d'actine, et génère la contraction de l'actomyosine [32]. Rho régule la contraction de l'actomyosine via son effecteur ROCK qui phosphoryle et ainsi inhibe la MLCptase (myosin light chain (MLC) phosphatase). En effet, la myosine II est activée par phosphorylation sur sa chaîne légère (MLC) [33].
- 5- **Détachement de l'arrière de la cellule** : Le détachement cellulaire se fait par l'arrière de la cellule tandis que le front de migration reste attaché à la matrice. Différents mécanismes interviennent dans le désassemblage des contacts focaux. Les protéines telles que la gelsoline et

la cofiline s'associe aux filaments d'actine et provoquent leur cassure tout en augmentant le « turnover » des filaments [34]. Les phosphatases limitent l'assemblage des protéines du cytosquelette [35]. La protéase Calpaïne clive les composants des plaques d'adhérence focale [36], [37] et la kinase FAK provoque leur désassemblage par un mécanisme encore mal connu [28]. A la suite du désassemblage des plaques, les intégrines se détachent du substrat et sont internalisées par les vésicules d'endocytose pour être recyclées [38].

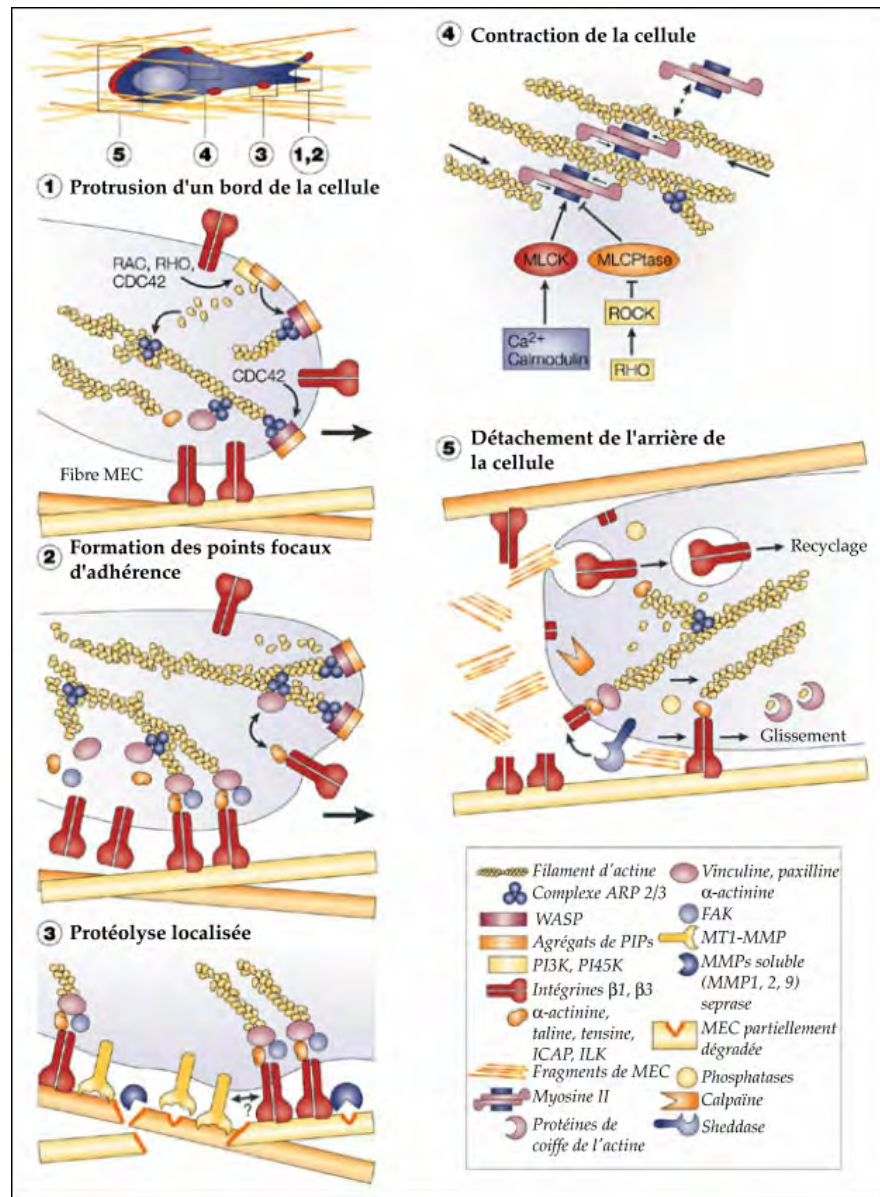


Figure I.4: Modèle en 5 étapes de la migration cellulaire en 3D.

- 1) Formation de protusions au front de migration.
- 2) Interaction avec la MEC et formation de contacts focaux.
- 3) Recrutement de protéases et protéolyse focale.
- 4) Contraction cellulaire par l'actomyosine.
- 5) Détachement de la cellule à l'arrière. Figure et légende d'après (Friedl et Wolf., 2003).

Les cellules tumorales peuvent disséminer en cellules isolées, dans ce cas on appelle le processus « migration individuelle » ou bien les cellules migrent en groupe en « migration collective ». Tandis que la plupart des tumeurs solides issues du stroma (leucémie, lymphome,..) dissémine via une migration individuelle, les tumeurs épithéliales utilisent généralement la migration collective.

La migration individuelle

Des études *in vivo* et *in vitro* ont permis d'observer que les cellules tumorales individualisées sont motiles [39]. Ces cellules individuelles proviennent soit du stroma interstitiel ou de la moelle osseuse, soit du compartiment multicellulaire comme un épithélium où elles ont perdues les contacts cellule-cellule, se sont détachées pour migrer de façon individuelle à travers le tissu conjonctif adjacent [40]. En fonction du type cellulaire, de l'engagement des intégrines, de la structure du cytosquelette et de la production des protéases, la migration individuelle s'opère selon différents modes tels que la migration mésenchymateuse, amoéboïde ou bien en chaînes.

La migration collective

La migration collective est un phénomène bien décrit qui se produit au cours du développement embryonnaire [41]. La migration collective est caractérisée par une migration des cellules en feuillets, tubes ou agrégats en restant jointives grâce aux jonctions adhérentes. Au contraire de la migration individuelle, les cellules migrant collectivement ne se rétractent pas mais l'adhésion cellule-cellule au sein du groupe permet l'assemblage de filaments d'actine corticale spécifique le long des jonctions cellulaires qui permettent la formation d'un grand corps contractile multicellulaire [42]. Un sous groupe de cellules ayant une motilité accrue au front de migration génèrent une traction via l'activité de leurs pseudopodes qui permet aux autres cellules présentes à l'arrière du groupe de migrer également. Pour dégrader et envahir la MEC, les cellules du front de migration adhèrent via les récepteurs membranaires d'adhérence comme les intégrines $\beta 1$ et $\beta 3$ pour former des foyers d'adhérence focale qui présentent une activité protéolytique focale envers la matrice extracellulaire et utilisent la machinerie contractile dépendante du réseau actine-myosine [20].

Selon le type de tumeurs, deux types de migration collective ont été décrits. La première correspond à des feuillets protrusifs qui maintiennent un contact avec le site de la tumeur primaire générant ainsi une invasion locale. C'est notamment le cas des cancers épithéliaux invasifs tels que le carcinome du colon [43] ou le carcinome des cellules basales. La seconde résulte de groupes de cellules détachées de la tumeur primaire qui s'étendent le long du tissu interstitiel ou bien le long des structures périneurales comme dans les mélanomes ou les rhabdomyosarcomes.

Dans les deux cas, la masse de cellules peut produire une grande concentration autocrine de facteurs pro-migratoire et de protéases de dégradation de la matrice. Les cellules au centre sont également protégées contre les cellules du système immunitaire telles que les lymphocytes et les NKs. L'avantage de la migration collective vient également du fait que les cellules présentes au sein du groupe sont hétérogènes (origine clonale différentes) elles ont donc des capacités différentes. Par exemple, les cellules les plus motiles permettent l'invasion de cellules qui le sont moins mais celles-ci peuvent être

potentiellement plus résistantes à l'apoptose et augmenter ainsi la probabilité de survie des cellules du groupe [20].

La migration mésenchymateuse

La migration mésenchymateuse se fait via le cycle de 5 étapes décrites précédemment. Celle-ci se trouve principalement dans les tumeurs du tissu conjonctif et dans les cancers épithéliaux après une dédifférenciation progressive [44], [45]. Il s'agit d'un mécanisme très efficace pour la dissémination des cellules tumorales et la formation de métastases [44]–[46]. Les cellules qui migrent de façon mésenchymateuse ont une morphologie fibroblastique de type fuseau dépendante de la dynamique d'adhésion médiée par les intégrines et des forces de traction présentes au deux pôles [47], [48]. Ainsi, la présence des métalloprotéases est importante pour la dégradation de la MEC ainsi que la présence des contacts focaux et la contraction cellulaire via l'actomyosine.

La migration amoéboïde

La migration amoéboïde regroupe les mouvements cellulaires des cellules rondes ou ellipsoïdes [39]. Les cellules migrant de façon amoéboïde forment des interactions rapides et faibles avec le substrat et ainsi elles n'adhèrent pas ou peu à la MEC. Le mouvement est généré par une contraction active du réseau actomyosine et des filaments d'actine corticale. Ces cellules n'ont donc pas de contacts focaux matures, d'activité protéolytique ni de fibres de stress. Ces cellules utilisent les forces mécaniques au lieu de la dégradation par protéolyse pour se déplacer à travers la matrice. En effet ces cellules sont très déformables grâce à l'absence de contacts focaux, elles utilisent donc un mode de migration par poussée propulsive ce qui leur permet de se déplacer beaucoup plus vite (vitesse de migration entre 10 à 30 fois plus élevée) que les cellules utilisant la migration mésenchymateuse. Les tumeurs amoéboïdes ont des niveaux d'expression très bas d'intégrines $\beta 1$ et $\beta 3$ et adhèrent donc très peu au collagène. La dissémination amoéboïde permet aux cellules cancéreuses de se détacher très tôt de la tumeur primaire pour former une métastase. Ce mécanisme est surtout observé dans les lymphomes et les cancers du poumon à petites cellules [20].

Plasticité morphologique des cellules tumorales

Il est important de souligner que les cellules tumorales sont capables, lorsqu'elles en sont contraintes, de changer de mode de migration, cette adaptation est appelée la plasticité cellulaire (**Figure I.5**). Ce changement s'effectue lorsque les cellules tumorales subissent des modifications de la capacité d'adhésion cellule-cellule, de la force de traction générée par les intégrines et le cytosquelette, du niveau d'adhérence au substrat (par modification de la composition ou de la densité de la MEC) ou du niveau requis de protéolyse. En conséquence, les cellules changent de mode migration passant de hautement adhésives à une migration nécessitant très peu d'adhérence, d'une migration par protéolyse à une migration non protéolytique, et ainsi de suite. Au cours de la progression tumorale, les cellules peuvent également subir des modifications d'expression de protéines ou bien de leur perte de fonction, comme par exemple une mutation sur une molécule d'adhérence, qui peut altérer le phénotype cellulaire et la capacité d'invasion. En réponse à ces changements, les cellules s'adaptent en changeant de mode de migration. Cette plasticité peut aussi se faire en réponse à un traitement anti-cancéreux visant à inhiber la migration cellulaire, les cellules cancéreuses utilisent alors cette stratégie d'échappement [20].

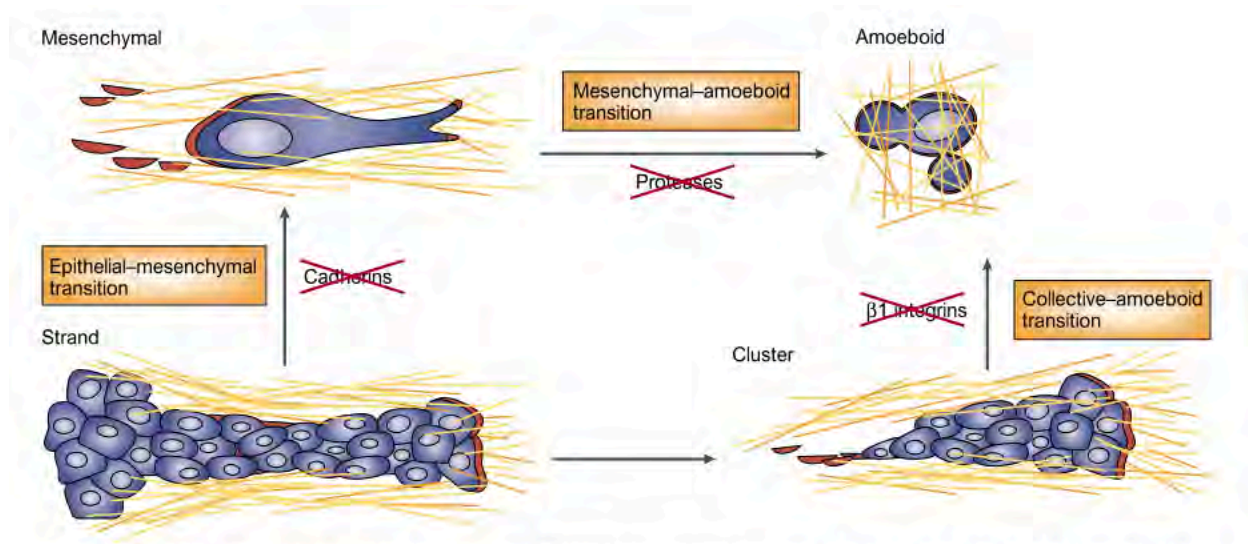


Figure I.5: Mécanisme de plasticité de l'invasion tumorale.

Les cellules cancéreuses sont capables de s'adapter en réponse à des modifications de leur programme moléculaire de migration. Dans des cellules migrant de façon collective, une cellule qui perd la capacité d'interaction cellule-cellule peut se détacher et utiliser les intégrines et les protéases pour adopter une migration mésenchymateuse (EMT). Quand les protéases telles que les MMPs, les sérines protéases et les cathepsines sont bloquées dans les cellules en cours d'EMT, ces cellules s'adaptent en utilisant la migration amoéboïde. La migration amoéboïde de cellules isolées peut aussi résulter de cellules en migration collective dans lesquelles l'intégrine $\beta 1$ a été inhibée. Figure et légende d'après (Friedl et Wolf., 2003).

Interaction entre le réseau d'actine et de microtubules au cours de la migration cellulaire

L'implication du réseau d'actine dans la migration cellulaire a été beaucoup étudiée. Comme décrit précédemment, il est maintenant bien établi que l'actine est essentielle à la migration cellulaire en permettant la protrusion au niveau du front de migration mais également via la formation et la maturation des structures d'adhérence. De plus, les fibres d'actomyosine permettent la rétraction de l'arrière de la cellule. Néanmoins, les microtubules, connus pour leur rôle dans la division cellulaire et le trafic vésiculaire, sont également apparus comme essentiels dans le processus de migration (**Figure I.6**). Tout d'abord, il a été montré que les microtubules, comme l'actine, jouent un rôle dans la protrusion. En effet, bien que dans une cellule en migration, le lamellipode soit essentiellement constitué d'un réseau dense et branché d'actine, quelques microtubules entrent dans le lamellipode et vont permettre la protrusion via :

- Leurs propriétés mécaniques : en exerçant une force pour pousser la membrane plasmique
- Leur rôle dans le trafic vésiculaire : en délivrant au front de migration des protéines impliquées dans la migration qui doivent être recyclées de façon dynamique comme par exemple Rac et cdc42 ou le complexe Arp2/3 nécessaire à la polymérisation de l'actine branchée.
- Leur interaction avec des molécules de signalisation : en régulant l'activité de ces protéines, en particulier les RhoGTPases et provoquant ainsi la polymérisation de l'actine.

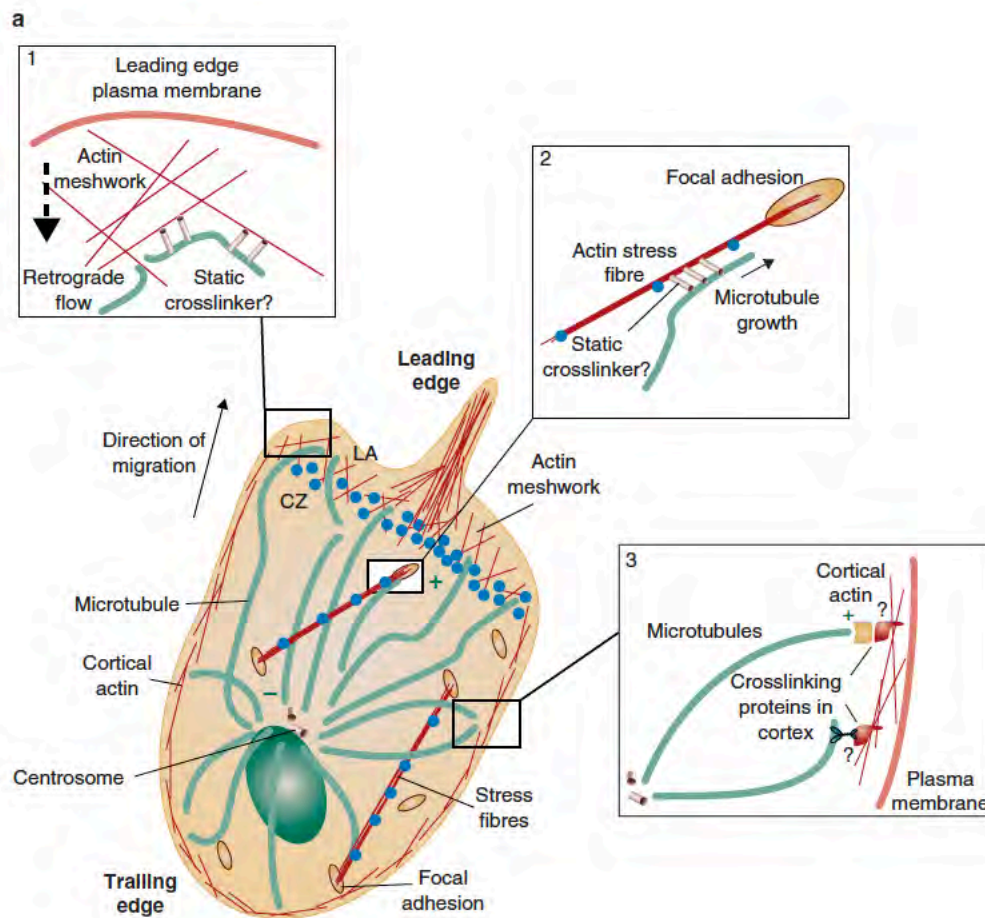


Figure I.6 : Interaction entre le réseau d'actine et de microtubules au cours de la migration cellulaire.

Dans les cellules en migration, les microtubules sont organisés par le centrosome qui est positionné entre le noyau et le front de migration. Les extrémités plus des microtubules sont orientées vers la membrane plasmique du front de migration. L'interaction entre les microtubules et l'actine a lieu dans différentes régions de la cellule en migration.

1 Au niveau du lamellipode, les microtubules sont couplés à l'actine qui subit un flux rétrograde. Ce processus comprime et casse les microtubules pour permettre leur renouvellement local.

2 Les microtubules peuvent cibler les plaques d'adhésions focales en s'associant et en polymérisant le long des faisceaux d'actine associés aux plaques.

3 L'extrémité plus des microtubules peut s'ancrer au cortex cellulaire via l'interaction avec les protéines associées aux extrémités plus et les protéines associées à l'actine pour orienter le centre organisateur des microtubules (MTOC) contrôlant ainsi la direction de la migration.

Figure et légende d'après (Rodriguez et al., 2003).

Les microtubules jouent également un rôle dans l'adhérence cellulaire. En effet, bien que les mécanismes ne soient pas encore bien connus, il a été montré que les microtubules contrôlent la formation, la maturation mais également le désassemblage des adhésions focales. Le contrôle de la formation et la maturation serait dû à la régulation des microtubules sur les RhoGTPases et en particulier

Rac alors que le contrôle du désassemblage impliquerait la kinase FAK [49]–[51]. Une étude suggère que les fibres de stress guideraient les microtubules aux adhésions focales. Certaines études suggèrent que les microtubules seraient également capables de moduler la contraction de l'actomyosine [52], [53].

Enfin, les microtubules contrôlent le trafic vésiculaire des intégrines et permettent le recyclage dynamique de celles-ci à la membrane plasmique et ainsi favorisent la migration cellulaire [54].

La coordination de ces deux réseaux, actine et microtubule, apparaît donc comme fondamentale pour une migration efficace. De nombreuses protéines ont été identifiées comme médiateurs de l'interaction entre actine et microtubule. C'est le cas notamment des spectraplakines qui permettent l'interaction physique localisée des microtubules avec l'actine près des foyers d'adhérence focale mais également APC (Adenomatous Polyposis Coli), MACF1/ACF7 (Microtubule-Actin Cross-linking Factor 1/Actin Cross-linking Factor 7) et CLASPs (CLIP-Associated Proteins) qui sont toutes les trois requises pour une migration directionnelle et qui sont aussi impliquées dans l'organisation et/ou la stabilisation des microtubules près du front de migration à proximité des foyers d'adhérence focale [55].

Intravasation et survie dans la circulation sanguine

L'intravasation correspond au passage des cellules cancéreuses à travers la membrane basale, formée par les cellules endothéliales et les péricytes, pour rejoindre la circulation sanguine ou lymphatique. L'intravasation est dépendante de l'accès des cellules cancéreuses au réseau vasculaire de la tumeur mais également au diamètre des vaisseaux. Ainsi, la production de facteurs angiogéniques favorisant la genèse et la dilatation des vaisseaux tels que le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF), le TGF β et les récepteurs à tyrosines kinases EGFR, est importante dans le processus d'intravasation. De même, la production de métalloprotéases est importante car elle favorise la perméabilité de ces vaisseaux. Ces facteurs sont issus des cellules tumorales elles-mêmes mais les cellules associées au stroma, par exemple, les cellules du système immunitaire, les cellules dendritiques et les macrophages associés à la tumeur (MATs), sont également capables de produire des facteurs angiogéniques et des facteurs de résistance à l'apoptose. Le microenvironnement tumoral est donc un élément clé dans la réussite de l'intravasation des cellules cancéreuses [56].

Lorsqu'elles sont entrées dans un vaisseau sanguin, les cellules cancéreuses sont alors appelées des cellules tumorales circulantes (CTCs). Ces CTCs sont alors soumises à différents stress. Tout d'abord, la perte d'adhérence qui conduit normalement à l'anoikis, un programme de mort cellulaire qui se produit lorsque les cellules se détachent de la MEC [57]. Ensuite les cellules doivent résister aux forces de cisaillement hémodynamiques qui déforment rudement les CTCs. Il a été montré que les plaquettes jouent un rôle fondamental dans la survie des CTCs dans la circulation sanguine en recouvrant celles-ci, augmentant ainsi leur résistance aux forces de cisaillement et facilitant leur survie. Enfin, les cellules doivent également échapper au système immunitaire et plus précisément aux NKs. Seulement 0,1% des CTCs survivent et moins de 0,01% de ces cellules sont capables de former des métastases dans un organe distant [56], [58].

Extravasation et formation de métastases

L'extravasation correspond au processus inverse de l'intravasation et consiste en la fixation et la traversée des vaisseaux sanguins (transmigration) par les cellules tumorales pour coloniser un organe distant. La capture mécanique des CTCs dans les capillaires est considérée comme le mécanisme principal de leur arrêt et de leur fixation aux vaisseaux. Les CTCs ainsi fixées vont former un embolie qui peut être à l'origine de la rupture du vaisseau et ainsi permettre l'extravasation. Pour rompre la barrière entre les vaisseaux sanguins et les tissus de l'organe distant, les cellules tumorales doivent rendre les tissus de l'organe distant perméables. Pour cela, il existe différents mécanismes utilisés par les cellules cancéreuses car la composition de la barrière du vaisseau diffère en fonction des organes et va donc influencer sur l'endroit de l'extravasation. Par exemple, l'extravasation et la formation de métastases des cellules de mélanome cutané sont augmentées par la sécrétion de l'osteonectine (SPARC), qui interagit avec VCAM-1 et permet ainsi le remodelage de l'actine et l'ouverture des jonctions endothéliales [59]. Une autre étude montre que les cellules tumorales facilitent l'extravasation en induisant un programme de nécrose dans les cellules endothéliales [60]. Divers gènes ont été identifiés comme étant impliqués dans le processus d'extravasation : La fascine-1 et autres composants des invadopodes, les ligands de la voie WNT, les médiateurs de la rupture des jonctions endothéliales et de la perméabilité vasculaire tels que l'angiopotine -4 (angptl4), le VEGF, COX2, MMP1 et l'osteonectine [61].

Mais pour que l'extravasation soit efficace, cela ne repose pas uniquement sur les interactions entre les cellules tumorales et endothéliales mais requière également l'intervention des cellules du microenvironnement. En effet, les plaquettes, les neutrophiles et les macrophages périvasculaires jouent également un rôle dans l'extravasation, par exemple, les plaquettes permettent l'extravasation en induisant un phénotype de type mésenchymateux dans les cellules tumorales [62] ou bien en sécrétant de l'adénine ce qui provoque l'ouverture des jonctions endothéliales [63]. Le microenvironnement est donc, de même que pour l'intravasation, un élément clé de l'extravasation et de la colonisation métastatique.

La colonisation métastatique nécessite que les cellules disséminées survivent dans un microenvironnement qui leur est étranger et soient capables de proliférer et former des tumeurs [64]. Ce microenvironnement tumoral est composé de sa propre MEC et de différents types cellulaires tels que des fibroblastes, des adipocytes, des cellules endothéliales et des cellules du système immunitaire. Ce microenvironnement forme avec les cellules tumorales un réseau complexe qui est important pour la formation et le développement des masses tumorales.

Cependant, les cellules tumorales doivent surmonter plusieurs obstacles. Tout d'abord, l'incompatibilité de ces cellules avec le microenvironnement pourrait les entrainer dans un état de quiescence avec une prolifération cellulaire inhibée. Par conséquent, les cellules disséminées peuvent persister sous forme de micro-colonies viables à l'état de dormance, état sous lequel elles peuvent rester pendant une très longue période (plus d'une décennie) [65]. Dans l'éventualité où les cellules proliféreraient continuellement, leur nombre pourrait ne pas augmenter à cause d'un important taux d'apoptose ou à cause d'un échec des cellules à déclencher une néo-angiogenèse [66]. Dans le cas contraire, une colonisation métastatique réussie pourrait être facilitée par l'expression de certains gènes qui semblent

dicter le tropisme métastatique spécifique d'organe. Un certain nombre de gènes facilitant le développement métastatique du cancer du sein dans certains organes a été identifié. L'IL-11 et CTGF (codant pour un facteur ostéolytique et angiogénique) semblent être la signature d'une métastase dans l'os [67] alors que l'épiréguline EREG, MMP1 et MMP2 semblent être la signature d'une métastase au poumon [68]. La formation de telles métastases constitue le point final de la cascade métastatique.

Co-option sur les vaisseaux

La dissémination intravasculaire, via les vaisseaux sanguins ou lymphatiques, a été imposée et est toujours acceptée comme paradigme central [69]. Néanmoins depuis plus de 15 ans, Lugassy et Barnhill ont mis en évidence un autre mécanisme de dissémination dans le mélanome cutané appelé « extravascular migratory metastasis » (EVMM) ou co-option vasculaire [70], [71]. Durant l'EVMM les cellules cancéreuses migrent le long des vaisseaux sans intravasation. Les cellules cancéreuses adhèrent à la surface abluminale (surface externe) du vaisseau (angiotropisme) et utilisent les capacités de motilité pour se déplacer le long du vaisseau. L'angiotropisme des cellules correspond à leur association avec l'endothélium du vaisseau, à l'endroit où se trouvent normalement les péricytes. La mise en évidence se fait par histologie avec la détection de l'avancée du front de la tumeur sans intravasation. Il a également été observé, au cours de l'EVMM, que les cellules tumorales peuvent également migrer le long d'autres « voies anatomiques » telles que les nerfs (neurotropisme) ou des structures annexes de la peau : follicules pileux, et canaux sudoripares eccrines (adnexotropisme) [72].

Au cours de l'angiogenèse les péricytes sont recrutés et commencent à migrer le long de la surface abluminale pour stabiliser les néo-vaisseaux [73]. Les péricytes ont été reconnus comme cellules souches mésenchymateuses (CSM) [74]. Comme décrit précédemment, les cellules tumorales invasives ayant subi une TEM possèdent des caractéristiques de cellules souches embryonnaires, il est donc concevable que les cellules invasives de mélanome cutané soient recrutées à la place des péricytes sur les vaisseaux et migrent le long de ces derniers de la même façon que les péricytes. De plus, certaines études ont montrées que la promotion de l'inflammation par les neutrophiles au niveau de la tumeur primaire, qui est induite par l'exposition aux UVs, augmente la propagation métastatique en augmentant les interactions entre les cellules de mélanome angiotropiques et les cellules endothéliales des vaisseaux [75]–[77] (**Figure I.7**).

Il y a une forte analogie entre l'EVMM et la migration des cellules de crêtes neurales au cours de l'embryogénèse [78]. En effet, au cours du développement embryonnaire de la souris, il a été montré que certaines cellules de crêtes neurales migraient le long des surfaces externes de canaux vasculaires [79]. De plus, une étude a montré que les cellules de mélanome cutané relancent un programme de migration embryonnaire et qu'une régulation aberrante de gènes impliqués dans le développement de la crête neurale pourrait promouvoir la plasticité et l'invasion du mélanome [80]. Il est donc possible que certaines cellules de mélanome angiotropiques utilisent les propriétés migratoires embryonnaires pour migrer le long des vaisseaux, ce qui est en accord avec la théorie de la graine et du sol de Paget car les cellules de mélanome pourraient migrer pour atteindre un lieu distant ayant un microenvironnement qui leur est favorable [64], [81], [82].

L'étude de l'expression des gènes des cellules mélanome cutané angiotropiques a permis d'identifier 20 gènes différemment exprimés qui seraient potentiellement impliqués dans l'EVMM [78] (**Tableau I.1**). Ces 20 gènes sont classés selon six catégories en fonction de leurs rôles. La plupart sont impliqués dans la progression du cancer, la migration cellulaire et la TEM. De façon intéressante, certains sont impliqués dans le recrutement des péricytes, l'inflammation et les propriétés de cellules souches.

L'EVMM représente donc, pour les cellules de mélanome, un mécanisme alternatif de propagation à la dissémination par intravasation des CTCs pour envahir des sites distants [71], [83]. Il a été montré que les cellules tumorales utilisant l'EVMM migrent à une vitesse de 0,1 à 2 $\mu\text{m}/\text{min}$ parcourant une distance de 5,2 à 105 cm/an [84]. Ces distances pourraient théoriquement être encore améliorées via une migration amoéboïde des cellules [20]. Cette vitesse est comparable avec l'intervalle de temps entre la reconnaissance de la tumeur primaire et la formation de métastases dans la progression du cancer humain.

Depuis la découverte de l'EVMM dans le mélanome, ce mécanisme a également été mis en évidence dans d'autres tumeurs : c'est le cas notamment du gliome et glioblastome [85]–[87], du cancer du pancréas [88], de la prostate [89], [90], du carcinosarcome gynécologique [91], des tumeurs périvasculaires [92] et plus récemment du mélanome uvéal [93]. L'EVMM est donc loin d'être un cas particulier du mélanome et apparaît comme un phénomène biologique important impliqué dans le développement métastatique.

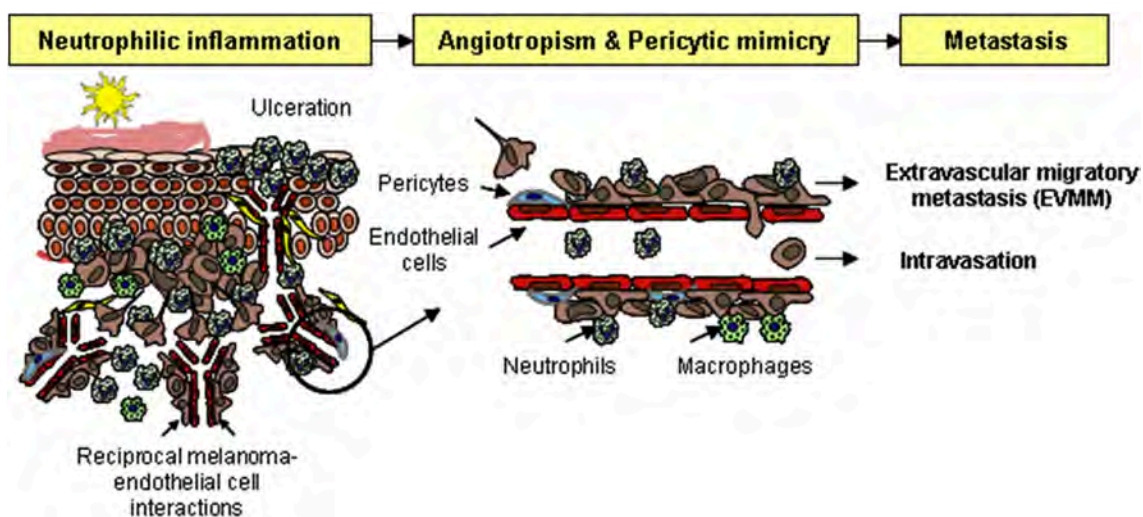


Figure I.7 : Le mécanisme d'EVMM.

Schéma de l'EVMM (extravasculaire migratory metastasis) : l'inflammation par les neutrophiles, induite par l'exposition aux UVs, donne un phénotype migratoire aux cellules de mélanome, augmente la propagation des cellules le long de la surface abluminale du vaisseau à l'endroit où se trouve normalement les péricytes et promeut la capacité métastatique.

Figure et légende d'après (Landsberg et al., 2016).

Table 2 Gene expression of angiotropic melanoma cells interacting with the abluminal vascular surface in a 3D coculture model

Cell migration	Cancer progression	EMT	Stem cell properties	Pericytic recruitment	Inflammation
CCL2	CCL2	CCL2	CCL2	PDGFB	CCL2
ICAM1	ICAM1	IL6	PDGFB		IL6
IL6	SELE	ICAM1	EVX1		TRAF1
RGNEF	TRAF1	PDGFB	CFDP1		CXCL6
RANBP9	IL6		RANBP9		SELE
PDGFB	SERPINB2				ICAM1
	CXCL6				SERPINB2
	BLID				SLC7A2
	MALT1				C2CD4B
	UPF1				PDGFB
	PLAA				
	RGNEF				
	ZXDC				

Sub-classification of 20 from the 28 differentially expressed genes in six categories.

Tableau I.1 : Classification des gènes différentiellement exprimés dans les cellules de mélanomes angiotropiques.

Tableau d'après (Lugassy et al., 2014).

Chapitre II : L'œil et le mélanome uvéal

1. Anatomie de l'œil

L'œil ou globe oculaire est l'organe de la vision. Il est de faible volume (6.5 cm^3), pèse 7 grammes, et a une forme globalement sphérique d'environ 24 mm de diamètre, complétée vers l'avant par une autre demi-sphère de 8 mm de rayon (la cornée). Sa fonction est de permettre la focalisation de la lumière sur la rétine qui va recevoir et transformer les vibrations électromagnétiques de la lumière en influx nerveux transmis au cerveau. La représentation anatomique de l'œil est présentée **Figure II.1**.

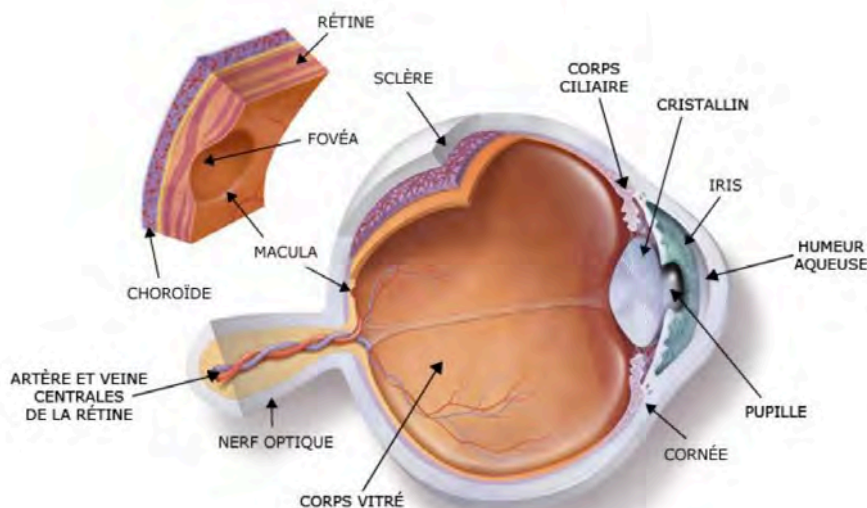


Figure II.1 : Schéma d'une coupe sagittale de l'œil.

L'uvée comprend la choroïde, le corps ciliaire et l'iris. Le cristallin délimite les deux segments constitués des milieux transparents de l'œil. En avant le segment antérieur comprend la cornée.

Image adaptée du site internet : <http://drleininge.fr/oeil-et-la-vision-anatomie-de-loeil>

La sclérotique est la tunique la plus externe. Elle est formée d'un tissu conjonctif dense, peu vascularisé et a un rôle de protection de l'œil. Du côté antérieur, cette sclérotique est remplacée par la cornée transparente qui permet la pénétration des rayons lumineux dans le globe oculaire. La cornée est riche en fibres nerveuses nociceptives permettant ainsi le clignement, réflexe protégeant le lobe oculaire des agressions extérieures, et la sécrétion lacrymale.

L'uvée est plus interne que la sclérotique et constitue une tunique vasculaire. Elle est formée par la choroïde, le corps ciliaire et l'iris. La choroïde et l'iris contiennent des mélanocytes issus de la crête neurale céphalique. La fonction des mélanocytes de l'uvée est de jouer un rôle de chambre noire, l'iris

servant de filtre, et permet de focaliser la lumière sur la rétine avec le cristallin. La choroïde absorbe l'excès de lumière.

- La choroïde tapisse la face interne de la sclérotique. Elle constitue une couche cellulaire fortement vascularisée et pigmentée par les mélanocytes. Son rôle principal est d'assurer une fonction nourricière.
- Le corps ciliaire est essentiellement formé de muscles lisses et est richement vascularisé. La contraction des muscles lisses modifie la forme du cristallin et permet ainsi l'accommodation. Le corps ciliaire est aussi responsable de la sécrétion de l'humeur vitrée et de l'humeur aqueuse qui maintiennent la pression intraoculaire et la forme du globe oculaire.
 - L'iris est la partie colorée et visible de l'œil. Il est pigmenté et donne sa couleur à l'œil. Il est aussi composé de muscles lisses qui permettent de contrôler la taille de la pupille, située au centre de l'iris. Ce contrôle de l'ouverture de la pupille permet de réguler la quantité de lumière qui pénètre dans l'œil.

Le cristallin est situé juste derrière l'iris et constitue une lentille transparente biconvexe molle. Il est composé de fines couches de cellules épithéliales anucléées superposées et dont le cytoplasme contient des protéines filamenteuses. Il se déforme sous l'action du muscle ciliaire pour la mise au point de la vue. Le cristallin sépare les chambres antérieure et postérieure.

La rétine est la tunique nerveuse de l'œil sensible à la lumière. Elle tapisse la face interne de l'œil et constitue aussi une couche neuroendocrine, directement en rapport avec le corps vitré. Elle contient, outre une importante vascularisation, des récepteurs photosensibles à proximité de la choroïde qui captent les rayons lumineux et les transforment en influx nerveux transmis au cerveau par le nerf optique. La rétine est constituée de deux tissus distincts, la rétine neurosensorielle ou neurorétine et l'épithélium pigmentaire ou rétine pigmentaire (RPE).

2. Les mélanocytes

Les mélanocytes sont des cellules dendritiques qui produisent de la mélanine dans des granules appelés mélanosomes permettant ainsi la pigmentation de la peau, des cheveux, des poils et de l'iris. Ils sont situés dans le derme, l'épiderme, l'œil (uvéa, rétine), l'oreille interne (cochlée, strie vasculaire), le cœur, les méninges et l'épithélium digestif. Les mélanomes se développent à la suite de la transformation et de l'hyper-prolifération des mélanocytes.

Origine embryonnaire des mélanocytes

Les cellules pigmentées de l'organisme, qui expriment la mélanine, hormis les cellules de la rétine pigmentaire, sont issues de la crête neurale (CN) [94]. La CN représente une population cellulaire transitoire possédant une grande capacité de migration et de différenciation en divers types cellulaires. La CN constitue la plupart du squelette facial et du système nerveux périphérique. De ce fait, les cellules de CN (CCN) sont multipotentes. Elles sont en effet capables de donner des neurones et des cellules gliales du système nerveux périphérique, des mélanocytes, certaines cellules endocrines et, au niveau de

la tête, les os et le cartilage du squelette facial, du tissu conjonctif et des muscles lisses. La **figure II.2** présente les différentes étapes de la formation de la CN durant la neurulation.

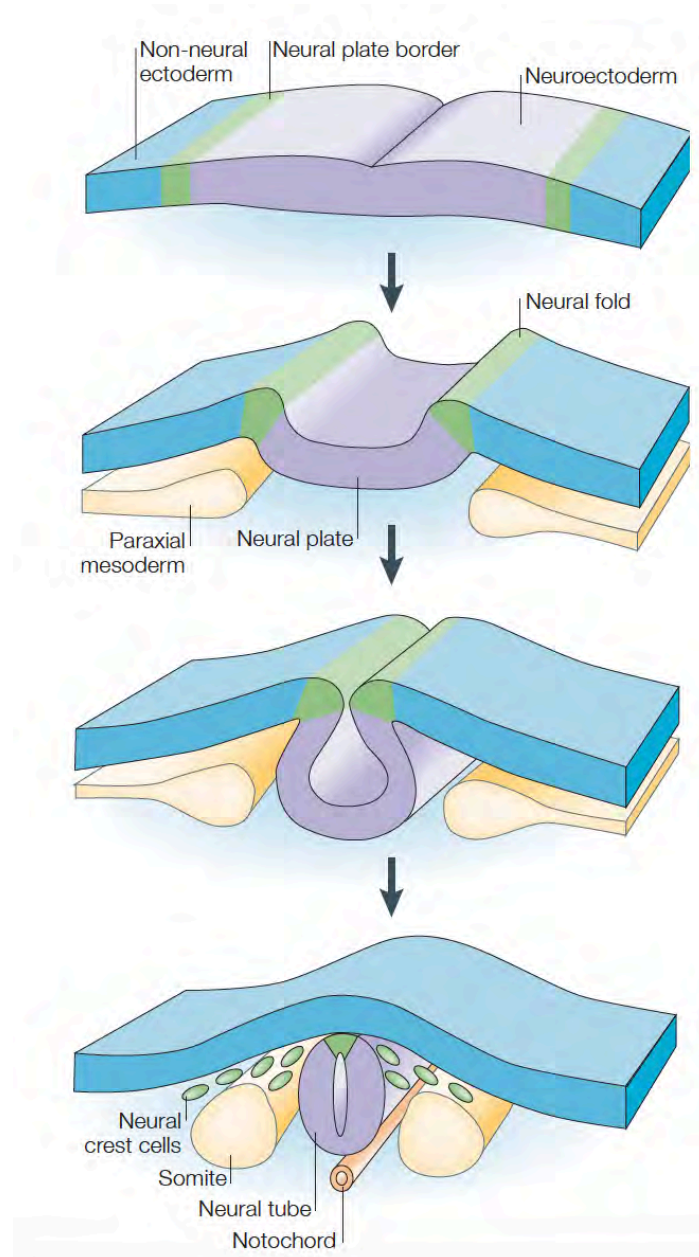


Figure II.2: Induction de la bordure et neurulation.

La bordure neurale (en vert) est induite entre le neuroectoderme (en violet) et l'ectoderme non neuronal (en bleu), grâce à des signaux émanant de ces deux territoires ainsi que du mésoderme paraxial sous-jacent (en jaune). Durant la neurulation, les bords de la plaque neurale s'élèvent (bourrelets neuraux) et se joignent pour former le tube neural. En fonction de l'espace considérée, les cellules de CN (en vert) délimitent des bourrelets neuraux ou de la partie dorsale du tube neural (cas montré).

Figure et légende d'après (Gammill et Bronner-fraser., 2003).

Durant le développement embryonnaire, la CN se forme à partir de la gastrulation en réponse à des signaux moléculaires extrinsèques et intrinsèques. Elle est d'abord induite par une série d'évènements moléculaires qui ont lieu à la bordure entre le futur neurectoderme et le futur ectoderme non neuronal. Pendant la neurogenèse, et à mesure que les bords de la plaque neurale s'épaississent et forment les bourrelets neuraux délimitant la gouttière neurale, les cellules de CN s'individualisent au niveau de la partie dorsale des bourrelets neuraux. Avant la fermeture du futur tube neural, les CCN vont délaminer et migrer à travers le corps pour donner naissance aux différents types cellulaires précédemment mentionnés [95]. La distribution des cellules dérivées des CCN suit un schéma dépendant de la position initiale des CCN le long de l'axe neural antéro-postérieur lors de la formation du tube neural. Ainsi, les CCN initialement localisées en position céphalique, vagale, troncale et cardiaque sont notamment à l'origine des mélanocytes, des os et du cartilage de la face (méssectoderme), des neurones et de la glie du système sensoriel périphérique et autonome, des cellules de Schwann du système périphérique et de certaines cellules endocrines [96]. Les cellules dérivées des crêtes neurales sont référencées le **Tableau II.1**.

NC Subtype	Tissues	Cell types	
Cranial	Craniofacial skeleton	Fibroblasts	Neurons
	Skin	Melanocytes	Glia
	Cornea	Adipocytes	Mesenchymal cells
	Connective tissue	Osteocytes	Myocytes
		Odontoblasts	Pericytes
Chondrocytes			
Cardiac	Branchial arches	Myocytes	
	Cardiac septum	Pericytes	
	Parasympathetic cardiac ganglia	Neurons	
		Glia	
Vagal	Enteric nervous system	Neurons	
		Glia	
Trunk	Peripheral nervous system	Neurons	
	Skin	Glia	
	Adrenal medulla	Melanocytes	
		Chromaffin cells	

It should be noted that individual NCC multipotency varies between subgroups as well as within subgroups themselves.

Tableau II.1 : Types cellulaires et tissus dérivés des cellules de la crête neurale.

En fonction de leur localisation initiale lors de l'émergence du tube neural, des voies de migration et du tissu auquel elles contribuent, les CCN peuvent être catégorisées en quatre sous-groupes : craniales, cardiaques, vagues, troncales. Les CCN craniales contribuent aux tissus et aux os de la face et se différencient en un large éventail de types cellulaires incluant les mélanocytes, myocytes, les fibroblastes et les neurones. Les CCN cardiaques peuvent se différencier en cellules gliales parasympathiques, en muscle squelettique de l'arc pharyngé, et en septum sous-aortique (etc...). Les CCN vagues fournissent principalement les neurones et les cellules gliales du système nerveux entérique. Enfin les CCN troncales deviennent des mélanocytes ou des neurones et des cellules gliales et chromaffines du système nerveux périphérique.

Figure et légende d'après (Delaney et al., 2014).

A cette étape, les cellules de CN perdent leurs interactions cellule-cellule et initient une réorganisation de leur cytosquelette ainsi que des changements morphologiques qui leur permettent de délaminer et de migrer. Ces capacités migratoires sont assurées par l'expression de récepteurs à leur surface ainsi que par l'expression de MMPs et de molécules d'adhérence qui leur permettent de répondre aux signaux de leur environnement et qui guident leur trajet migratoire [97]. Ce processus est finement régulé et orchestré par un réseau de gènes formant des modules contrôlant chaque étape du développement de la CN jusqu'à sa complète différenciation [98].

Rôle des mélanocytes

Le rôle des mélanocytes a surtout été décrit pour les mélanocytes cutanés. Le rôle des mélanocytes non cutanés est encore mal compris. Cependant quatre rôles majeurs des mélanocytes ont été identifiés :

- Un rôle dans la pigmentation, comme décrit précédemment. Chez l'humain, la mélanogénèse uvéale survient dès la 20^{ème} semaine de vie embryonnaire et s'arrête quelques semaines après la naissance [99]. C'est notamment pour cela que l'iris atteint sa couleur définitive quelques mois après la naissance. La quantité de mélanine produite par les mélanocytes uvéaux varie selon les individus et sont deux fois plus nombreux chez les noirs-américains par rapport aux eurasiens.
- Un rôle dans la protection contre les rayons UVs. En effet, les mélanocytes cutanés protègent la peau des UVs en transférant leurs mélanosomes aux kératinocytes avoisinants.
- Un rôle dans la protection contre les radicaux libres [100].
- Un rôle sensitif pour la vision, l'ouïe et l'équilibre [101].

Bien que le rôle des mélanocytes non cutanés (notamment ceux situés dans l'oreille, l'appareil digestif et le cœur) soit encore mal compris, il semblerait que leur présence soit importante pour le bon fonctionnement de l'organe dans lequel ils se situent. Bien que leur fonction semble être indépendante de la production de mélanine, leur absence peut aboutir à certaines pathologies. En effet, les albinos, chez qui la dépigmentation ne provient pas de l'absence de mélanocytes, ne souffrent pas typiquement de surdité, alors qu'elle est fréquente dans le syndrome de Waardenburg lié à une migration anormale des mélanocytes.

Pathologies associées aux mélanocytes uvéaux

Anomalies de pigmentation des mélanocytes uvéaux

Il existe certains syndromes liés à un défaut de pigmentation dans certaines parties de l'organisme. Ce défaut de pigmentation peut être dû soit à des défauts de migration, de différenciation, de prolifération ou de maturation des mélanoblastes au cours du développement embryonnaire, ou bien un défaut de fonction des enzymes de la mélanogénèse.

Le syndrome de Waardenburg (SW) est caractérisé par des défauts de pigmentation qui peuvent se situer sur la peau, les cheveux ou l'iris et peuvent être accompagnés de problèmes d'audition [102]. Les anomalies de pigmentation au niveau oculaire sont caractérisées par des iris bleus vifs ou atrophiques et par un aspect albinoïde du fond d'œil à cause d'une déficience en nombre de mélanocytes uvéaux [103]. Il existe 4 sous-types de SW identifiés qui se distinguent par la présence ou non d'anomalies se rajoutant aux problèmes de pigmentation. Au niveau moléculaire, les anomalies décrites sont le résultat de délétions chromosomiques ou de mutations affectant les facteurs de transcription PAX3, SOX10 et MITF ou le récepteur à l'endothéline (EDNRB) et son ligand EDN3 [104]–[106]. L'inactivation de ces gènes conduit à des défauts de développement, de différenciation et de migration/prolifération des cellules de CN.

L'albinisme résulte d'anomalies génétiques conduisant à une diminution ou une absence de mélanine associées à un nombre de mélanocytes normal [107]–[109]. Il existe différents types d'albinisme : oculocutanés (AOC I, II, III), oculaire (AO1), syndromes de Griscelli (SG), d'Hermansky-Pudlak (SHP) et de Chediak-Higashi (SCH). Les manifestations les plus caractéristiques sont un défaut de la vision, une hypopigmentation de la peau, des cheveux, des poils et des yeux. Ces différents types d'albinisme impliquent des mutations dans différents gènes qui vont conduire soit à une anomalie de la mélanogénèse soit à une anomalie de la formation et du mouvement des mélanosomes.

Les mélanoses oculaires congénitales sont caractérisées par une teinte sclérale et épisclérale ardoisée ou bleutée, le plus souvent répartie de façon irrégulière due à une migration anormale des mélanocytes qui s'accumulent anormalement dans la sclérotique et l'uvée. Lorsque cette pigmentation s'étend aux paupières et aux plans cutanés du même côté, il s'agit alors d'un nævus fusco-coeruleus ophtalmo-maxillaris de Ota. Bien que cette pathologie soit bénigne, les personnes atteintes de mélanoses oculaires ont une prédisposition au développement d'un mélanome de la choroïde, orbitaire ou méningé [110].

Anomalies d'hyper-prolifération des mélanocytes uvéaux

Le nævus choroïdien est une tumeur bénigne située dans la choroïde et qui est retrouvée chez 6,5 % de la population [111]. Le diagnostic du nævus choroïdien peut s'avérer difficile étant donné sa ressemblance clinique avec le mélanome choroïdien. Il est donc nécessaire de détecter le caractère évolutif du nævus. Les petits nævi (<5mm de diamètre), plats et asymptomatiques sont considérés comme sans risques [112], mais le diagnostic devient plus compliqué quand les nævi ont un diamètre supérieur à 7mm, une épaisseur supérieure à 2mm et deviennent symptomatiques. Dans ce cas, ils sont considérés comme suspects car en cas d'évolution de ces nævi, on considère qu'ils peuvent évoluer en

mélanome bien que le risque de dégénérescence d'un naevus choroïdien en mélanome est faible (1/8845 par an) [112].

Le mélanocytome est une tumeur mélanocytaire bénigne, rare, de petite taille, pigmentée et située dans la papille. La tumeur a une croissance lente et est de bon pronostic. Elle est histologiquement assimilée à un naevus dont la transformation maligne est exceptionnelle. Une étude suggère que le mélanocytome serait dû à une prolifération anormale des mélanocytes uvéaux dans la partie antérieure du nerf optique [109], [113]. De même que dans le mélanome uvéal, des mutations des gènes GNAQ et GNA11, sont retrouvées dans le mélanocytome [114]. Ces mutations sont à l'origine de la prolifération accrue notamment par l'activation constitutive de la voie MAP kinase (détaillé plus loin).

Enfin, le mélanome uvéal est une tumeur maligne due à la prolifération des mélanocytes de l'uvée. Bien qu'ayant la même origine embryonnaire Les mélanomes uvéaux et cutanés ne partagent pas les mêmes altérations chromosomiques ni les mêmes mécanismes moléculaires. Il s'agit donc de deux cancers bien distincts. La partie suivante décrit plus en détails le mélanome uvéal.

3. Le mélanome uvéal

Généralités

Le mélanome uvéal est un cancer rare mais il s'agit du plus commun des cancers primaires intraoculaires chez l'adulte, affectant environ 0,7/100 000 personnes par an dans la population occidentale et aux États-Unis [115]–[117] et constitue 3 à 5% de tous les mélanomes [118]. Le mélanome provient des mélanocytes dérivés de la crête neurale et localisés dans l'uvée. Lors du diagnostic, environ 30% des patients ne présentent pas de symptômes et chez les autres patients les symptômes apparaissent tardivement, c'est pourquoi la tumeur peut avoir déjà disséminé au moment du diagnostic [119]. Ainsi, malgré le traitement de la tumeur primaire, par énucléation ou traitement conservateur, jusqu'à 50% des patients meurent à la suite du développement de métastases localisées majoritairement dans le foie dans les années qui suivent le diagnostic (mortalité de 30% à 5 ans et de 50% à 10 ans [120]). Le délai de survie médian après apparition des métastases est d'environ 6 mois et il n'existe actuellement pas de traitement efficace pour soigner les métastases et ainsi améliorer la survie des patients. Plusieurs facteurs cliniques, histologiques et des marqueurs génétiques ont été identifiés pour prédire le pronostic de survie des patients ce qui a permis de classifier les patients en plusieurs catégories en fonction du risque métastatique.

Epidémiologie

Le mélanome uvéal primaire est localisé majoritairement dans la choroïde (85 - 90%) et de façon minoritaire dans le corps ciliaire (5 - 8%) ou l'iris (3 - 5%) [118]. Il touche 500 à 600 nouveaux cas par an en France et 2000 à 2500 nouveaux cas aux États-Unis [121]. L'apparition du mélanome survient entre 50 et 80 ans, l'âge médian de diagnostic est d'environ 62 ans avec cependant un pic entre 70 et 79 ans [118]. Les enfants et les adolescents sont très rarement touchés par ce type de cancer.

L'incidence varie en fonction du sexe, de la race et du pays. Les hommes ont une incidence de 30% supérieure comparée aux femmes. Aux États-Unis, l'incidence est d'approximativement 5 par million

d'individus avec une augmentation significative chez les personnes blanches non hispaniques (6,03 par million) comparée aux personnes noirs et asiatiques (0,31 et 0,39 par million, respectivement). L'incidence pour les Hispaniques se situe entre les deux avec 1,67 par million. En Europe, l'incidence augmente avec la latitude, passant de 2 par million en Espagne et en Italie, de 4 à 6 par million dans l'Europe centrale et à plus de 8 par million au Danemark et en Norvège. L'incidence en Corée du Sud est similaire à celle des Asiatiques aux Etats-Unis à 0,42 par million [118].

Prédispositions et facteurs de risque

Il existe certains facteurs de prédisposition au mélanome uvéal. La plupart des patients atteints de mélanome uvéal ont plus de 60 ans. Les personnes Caucasiennes sont touchées de façon plus importante par le mélanome uvéal. De plus, les personnes aux yeux et à la peau clairs et ceux qui présentent une incapacité à bronzer sont plus prédisposés au mélanome uvéal [122]–[124]. Bien que cela suggère une implication de l'exposition aux UVs, ce facteur n'est actuellement pas clairement défini dans le développement du mélanome uvéal [125]–[128].

La présence de nevi iridiens, choroïdiens, ou d'une mélanocytose congénitale oculaire de même que la présence de neurofibromatose de type 1 sont considérées comme des facteurs prédisposant au mélanome uvéal [111], [112], [129]. Le mélanome uvéal est rarement héréditaire (<1%) c'est pourquoi les approches permettant d'identifier des gènes impliqués dans la prédisposition sont limitées [130], [131]. Cependant, les cas familiaux reportés ont mis en évidence des mutations du gène BAP1 (la mutation du gène BAP1 est détaillée plus loin).

Symptômes et Diagnostic

Les symptômes du mélanome uvéal dépendent de la localisation de la tumeur. Cependant, ils sont souvent asymptomatiques et sont découverts à la suite d'un examen ophtalmologique de routine (**Figure II.3**).

Dans le cas de mélanome de l'iris, le patient peut remarquer la présence d'une tâche brune sur l'iris dont la taille augmente. Si une douleur est ressentie, elle résulte de l'augmentation de la pression intraoculaire due à un glaucome secondaire. Le glaucome peut également provoquer une diminution de la vision périphérique voir provoquer une cécité. La tumeur peut également provoquer une distorsion de la pupille. En raison de leur visibilité, les tumeurs de l'iris sont plus petites au moment du diagnostic que les tumeurs de la choroïde et du corps ciliaire [111].

Les symptômes du mélanome du corps ciliaire apparaissent lorsque celui-ci atteint une taille importante avec également une perte d'acuité visuelle due à la compression de la lentille, un déplacement du cristallin ou un décollement de la rétine.

Les symptômes du mélanome choroïdien sont plus précoces lorsque la tumeur est localisée proches des centres de la vision (métamorphopsies, baisse de l'acuité visuelle, amputation du champ visuel). Pour les tumeurs plus périphériques, le signe clinique le plus fréquent est une photopsie persistante, on peut également noter une amputation du champ visuel lié soit à un décollement de rétine associé soit au

volume de la tumeur et une baisse de l'acuité visuelle. Plus rarement, le diagnostic tardif peut se manifester par un œil rouge et douloureux.

Le diagnostic du mélanome uvéal se fait par un examen ophtalmologique via des tests tels que : fond d'œil, ultrasonographie, transillumination, tomographie par cohérence optique, angiographie à la fluorescéine, etc... [115]. Environ 30% des patients n'ont aucuns symptômes au moment du diagnostic [132]. Après le diagnostic de la tumeur primaire on réalise le dépistage des métastases du foie, qui sont présentes chez moins de 2% des patients [133].

Les mélanomes choroïdiens présentent souvent une masse choroïdienne, le plus souvent pigmentée mais parfois achrome, discoïde en forme de « dôme » ou de « champignon ». Les mélanomes de l'iris peuvent aussi présenter une lésion en « dôme » généralement localisée. Les mélanomes diffus de l'iris sont une forme particulière, rare, qui se manifeste par une hétérochromie progressive de l'iris avec une infiltration plane de ce dernier et un envahissement diffus de l'angle iridocornéen.

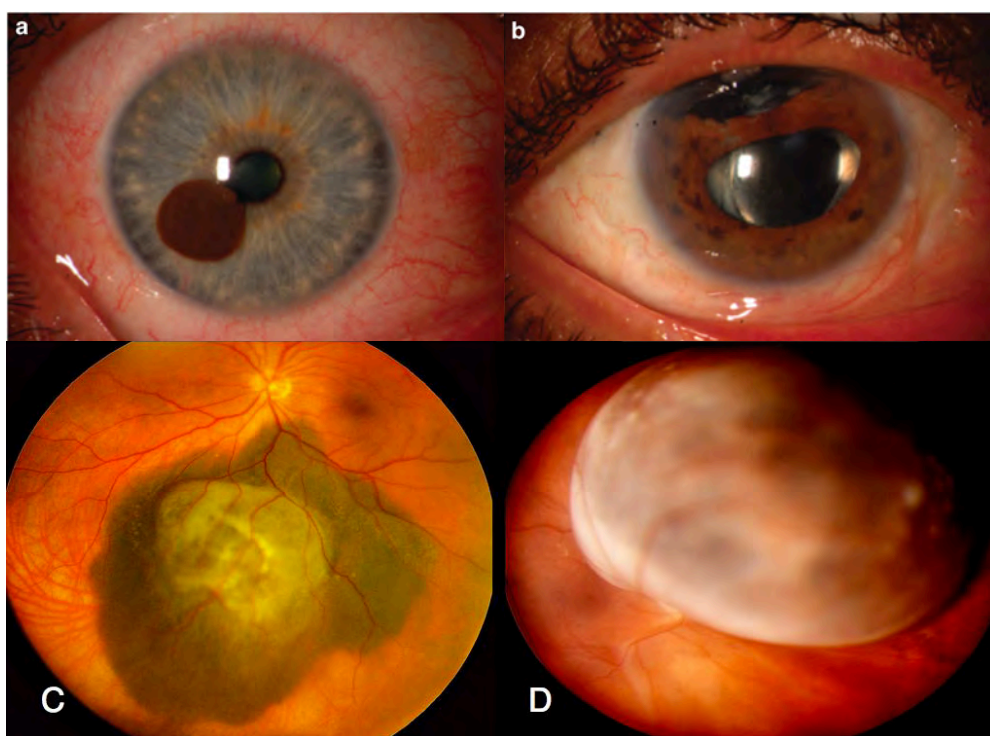


Figure II.3: Le mélanome uvéal.

- a) Mélanome de l'iris.
 - b) Mélanome du corps ciliaire avec envahissement de la racine de l'iris.
 - c) Mélanome choroïdien pigmenté visualisé par fond d'œil.
 - d) Mélanome choroïdien en partie achrome de taille importante visualisé par fond d'œil.
- Figure et légende d'après (Kaliki et Shields., 2017) (Shields et al., 2015).

Facteurs pronostiques

La taille de la tumeur est l'un des paramètres cliniques le plus important dans l'établissement du pronostic. La taux de mortalité à 5 ans chez les patients ayant une tumeur inférieure à 10 mm de diamètre est d'environ 15% tandis qu'il augmente à 53% chez les patients ayant une tumeur supérieure à 15 mm de diamètre [134]. La localisation de la tumeur est également un facteur important, en effet les tumeurs du corps ciliaire corrént avec un mauvais pronostic de survie tandis que celles de l'iris sont associées au bon pronostic [135].

Le pronostic repose également sur l'analyse des différents types cellulaires présents dans la tumeur. Les mélanomes uvéaux peuvent être constitués de deux types cellulaires: des cellules fusiformes et des cellules épithélioïdes. Le terme épithélioïde remplace le terme épithélial dans le cas de cellules cancéreuses. La tumeur peut aussi être mixte, c'est-à-dire qu'elle est constituée d'un mélange de cellules fusiformes et épithélioïdes. Les tumeurs constituées de cellules épithélioïdes ou mixtes sont associées à un risque métastatique plus élevé et donc à un moins bon pronostic de survie [136] tandis que les tumeurs constituées de cellules fusiformes sont associées à un meilleur pronostic. Le pronostic des mélanomes mixtes dépend donc du pourcentage de cellules épithélioïdes dans la tumeur.

Les tumeurs présentant une invasion du nerf optique post laminaire ou une extension extra oculaire sont de mauvais pronostics de même que la présence de boucles vasculaires [137], [138]. Enfin, les paramètres génétiques (anomalies chromosomiques) sont également investigués car le mélanome uvéal est caractérisé par des réarrangements chromosomiques simples et récurrents dont certains corrént avec un haut risque métastatique et un mauvais pronostic de survie des patients. Ceux-ci seront détaillés plus loin (voir partie II.2 Anomalies chromosomiques).

Traitement de la tumeur primaire

Les traitements du mélanome uvéal se distinguent en deux catégories, d'une part l'énucléation qui était considérée pendant de nombreuses années comme la seule option thérapeutique et d'autre part les thérapies dites conservatrices développées à partir des années 1970. Ces traitements représentent une alternative moins agressive car ils permettent de détruire la tumeur tout en préservant mieux l'œil et la vue des patients car ils limitent au maximum les séquelles au niveau des tissus sains avoisinants. Néanmoins, le traitement du mélanome dépend de nombreux facteurs : la localisation de la tumeur, sa taille, l'âge du patient, le statut de l'acuité visuel de chaque œil, la présence d'une extension extra-sclérale et de l'état de santé générale du patient [111].

Le mélanome de l'iris est généralement traité par irradiation pour les tumeurs localisées. La résection chirurgicale n'est plus recommandée. Certaines formes diffuses (mélanome diffus de l'iris ou ring melanoma) sont le plus souvent énucléées.

Pour le traitement des mélanomes du corps ciliaire et de la choroïde, celui-ci dépend des différents facteurs. L'énucléation est réalisée lorsque la masse tumorale est trop importante (diamètre supérieur à 18mm et d'une épaisseur supérieure à 10mm) ou bien qu'elle a atteint le disque optique et la sclérotique ou que le patient présente un glaucome secondaire. A la suite de l'opération, une prothèse oculaire est

installée à la place de l'œil énucléé. Les autres thérapies possibles sont : la curiethérapie, la protonthérapie ou la résection locale dans de très rare cas.

La curiethérapie est la méthode la plus couramment utilisée puisqu'elle peut être réalisée indépendamment du site d'origine de la tumeur. Ce traitement consiste à appliquer un disque d'or radioactif sur la tumeur qui contient des grains d'iode 125 (le plus souvent) ou de ruthénium 106 qui émettent des rayons γ et β respectivement. Bien que ce traitement soit très efficace dans le contrôle de la tumeur, des complications existent et peuvent mener à une perte d'acuité visuelle voir à l'énucléation. De plus, le ruthénium 106 ne peut pas être utilisé sur des tumeurs supérieures à 6 mm de diamètre et l'iode sur des tumeurs de plus de 10 mm d'épaisseur. Les tumeurs ayant un diamètre supérieur à 20 mm ne peuvent pas être irradiées par plaque.

La protonthérapie utilise des faisceaux de proton qui ciblent la tumeur en préservant les tissus sains avoisinants. De même que la curiethérapie, cette technique permet un bon contrôle de la tumeur mais il y a une possibilité de perte d'acuité visuelle avec en plus des risques de complications pouvant mener à l'apparition d'un glaucome. En France deux sites, localisés à Orsay et Nice, proposent cette thérapie. 70% des patients bénéficient d'un traitement par protonthérapie dont la grande majorité est traitée sur le site d'Orsay de l'institut Curie.

La résection locale est une procédure chirurgicale permettant de retirer la tumeur tout en préservant la sclère et la rétine. Les complications possibles sont : l'hémorragie intraoculaire, le détachement de la rétine, et la cataracte.

La thermothérapie transpupillaire repose sur l'utilisation d'un laser infrarouge à 810 nm traversant la pupille jusqu'à 4 mm de profondeur afin d'induire une nécrose immédiate de la tumeur postérieure par hyperthermie. Cette technique, qui a l'avantage d'être très peu coûteuse, n'est aujourd'hui plus utilisée car des études ont montré que son association avec la curiethérapie ne permettait pas d'obtenir de meilleurs résultats et, au contraire, augmentait la récurrence tumorale. De plus, cette technique entraîne des complications pouvant mener à une perte d'acuité visuelle voir à l'énucléation [139]–[142].

Bien que les traitements conservateurs soient favorisés en raison de leurs avantages, une étude réalisée par le « Collaborative Ocular Melanoma Study Group » (COMS) montre que le taux de survie des patients est équivalent entre ceux traités par traitements conservateurs et ceux traités par énucléation [143]. Cela suggère donc que la dissémination du mélanome uvéal serait un événement très précoce qui surviendrait avant le diagnostic. De nouvelles thérapies sont actuellement en cours d'essais cliniques dont les enjeux sont de mieux cibler les cellules tumorales et ainsi de mieux préserver les tissus sains avoisinants.

Parmi ses thérapies ciblées, se trouve la protéine immuno-conjugué ICON-1 développé par Iconic Therapeutics qui est un variant structural de la protéine « factor VII » dont le récepteur transmembranaire « tissue factor » est surexprimé dans les tumeurs de mélanome uvéal et participe à l'angiogénèse. L'interaction d'ICON-1 avec « tissue factor » empêche la cascade de signalisation angiogénique et permet l'élimination des cellules cancéreuses par le système immunitaire. Cette thérapie est actuellement en phase I d'étude [144].

Une autre approche développée par Aura Biosciences consiste à utiliser une nanoparticule virale AU-011 qui est administrée par injection intra-vitale et activée par laser infrarouge. Le conjugué viral s'associe spécifiquement aux cellules tumorales car celles-ci surexpriment le sulfate d'héparane et détruisent leur membrane plasmique après activation par un laser. Ce traitement est actuellement en phase 1b/II [144].

Evolution métastatique

Malgré la présence de traitements locaux, le taux de survie des patients atteints de mélanome uvéal reste inchangé depuis 40 ans. Celui-ci varie en fonction des facteurs pronostics, par exemple le taux de survie à 5 ans est de 74% pour les tumeurs de petites tailles, 60% pour les tumeurs moyennes et 42% pour les grosses tumeurs [120]. Les patients atteints de mélanome uvéal ont un risque très élevé de développer des métastases localisées principalement dans le foie mais également dans les poumons, la peau, les os ou le cerveau [145]–[148]. Un suivi systématique des patients est donc réalisé afin de détecter la survenue de ces métastases. Contrairement au mélanome cutané, le mélanome uvéal ne métastase pas dans les ganglions lymphatiques ce qui s'explique par un manque de drainage lymphatique choroïdien. Cependant, il ne s'agit probablement pas du seul facteur car même lorsque la tumeur est extériorisée, donc en contact avec le drainage lymphatique de l'orbite, aucune métastase ganglionnaire n'est observée.

Le taux de survie à 15 ans pour les patients atteints de mélanome uvéal est de 53% [134], il a également montré un pic de mortalité à 3 ans de 24% [149]. Cela peut indiquer un état de dormance ou de latence pendant lequel les CTCs sont indétectables dans les 2 ans suivant le diagnostic [150]. Les métastases répondent rarement au traitement et sont en général mortelles dans les deux à neuf mois après apparition des premiers symptômes [151], [152]. Si le foie est affecté, le taux de survie se situe entre 6 mois et un an.

Il y a donc un besoin urgent de nouvelles thérapies plus efficaces, c'est pourquoi les essais cliniques visant à tester de nouveaux traitements contre les métastases hépatiques sont fortement encouragés. Ainsi, ces dernières décennies, des efforts considérables ont été réalisés dans le but de mieux comprendre les altérations génétiques impliquées dans le développement et la progression du mélanome uvéal, de diagnostiquer les tumeurs à haut risque de métastases et d'identifier les voies de signalisation et les molécules dérégulées dans les mélanocytes tumoraux qui pourraient être ciblés par les molécules à effet thérapeutique. La suite de ce chapitre détaillera les anomalies chromosomiques ainsi que les voies de signalisation dérégulées dans le mélanome uvéal puis nous verrons quelles sont les nouvelles pistes pour le développement de traitement contre les métastases hépatiques.

Anomalies chromosomiques

Il a été montré depuis les années 1990 que le mélanome uvéal présente des anomalies cytogénétiques relativement simples et non aléatoires [153]. Ces anomalies affectent principalement les chromosomes 1, 3, 6 et 8 et ont été identifiés par des analyses du caryotype, FISH (hybridation *in situ* à fluorescence sur chromosome) ou bien par CGH (hybridation génomique comparative) sur du matériel biologique obtenu après énucléation [154], [155]. Les anomalies correspondent soit à la perte totale d'un chromosome

(aneuploïdie) ou partielle d'une partie du bras court (p) ou du bras long (q) ou bien à une amplification totale ou partielle par duplication (polyploïdie).

Chromosome 1 : la perte d'une partie ou de la totalité du chromosome 1 se produit chez un quart des patients et est souvent associée avec une monosomie du chromosome 3 [156]. La perte du 1p diminue le pronostic de survie sans métastases indépendamment du statut du chromosome 3 [157]. Une analyse de 70 tumeurs a permis d'identifier la région commune de 55 Mb au locus 1p31. Aucune mutation n'a été mise en évidence dans cette région mais il existe des candidats potentiels : HES2 et HES5 qui font partie de la voie Notch et l'homologue de p53, TP73 [158].

Chromosome 3 : la perte d'une copie du chromosome 3 (monosomie) a lieu chez près de la moitié des patients et est de loin le marqueur chromosomique le plus important pour le pronostic de survie du mélanome uvéal. En effet, la monosomie du 3 est associée à des facteurs cliniques et histopathologiques de mauvais pronostic et corrèle avec l'apparition métastatique [159]. Cette anomalie correspond à un évènement précoce puisqu'il est généralement associé à d'autres anomalies chromosomiques connues [160].

Chromosome 6 : le gain du 6p et la perte du 6q se produit chez un quart à un tiers de patients. Ces deux anomalies sont souvent retrouvées au sein de la même tumeur ce qui suggère la formation d'un isochromosome 6p [161] et correspondent à des événements précoces durant le développement de la tumeur. Elles sont fréquentes dans le mélanome uvéal et cutané [137]. Le gain du 6p donne un meilleur pronostic de survie ce qui suggère qu'il a un effet « protecteur » sur l'apparition des métastases [162], [163]. Cependant, cela peut s'expliquer également par le fait que le gain du 6p se produit généralement en absence de monosomie du 3 [164]–[166]. La perte du 6q se retrouve dans plus de 25% des tumeurs et est corrélée avec un fort risque métastatique.

Chromosome 8 : la perte du 8p est retrouvée dans un quart des tumeurs et le gain du 8p dans 40% des cas. Le gain du 8q est associé à l'apparition de métastases et est souvent combiné aux altérations des chromosomes 3 ou 6 et serait un évènement tardif qui ferait suite à l'apparition des anomalies de ces chromosomes [164], [167]. Quand le gain concerne la partie distale du 8q, l'altération est associée au chromosome 6, à l'inverse quand le gain concerne le 8q entier, il est le plus souvent couplé à la monosomie du 3. Son association avec la monosomie du chromosome 3 montre une forte corrélation avec l'apparition de métastases. Des isochromosomies (2 à 4 copies) du 8q sont également retrouvées en association avec la monosomie du chromosome 3 dans les tumeurs qui ont métastasé. Certains oncogènes localisés sur le 8q, dont MYC (8q24), NBS1 (8q21) [168] et DDEF1 (8q24) [169] ou d'autres gènes tels que PTP4A3 /PRL-3(8q24.3) [170] pourraient être des facteurs contribuant au développement du mélanome uvéal.

La monosomie du chromosome 3, la perte du 1p et l'amplification du 8q sont corrélées à une mortalité élevée et une propension à l'aneuploïdie tandis que l'amplification du 6p et du 8q distal sont de bons pronostics de survie [164]. Ainsi, les patients ayant une monosomie du chromosome 3 couplée au gain du 8q sont ceux ayant le plus mauvais pronostic de survie car ces facteurs de risque sont significativement corrélés à une forte mortalité [115], [137], [159]. La monosomie du chromosome 3 seul ou le gain du 8q seul représente un risque moyen de développement métastatique dont la mortalité est

intermédiaire. Tandis que les tumeurs présentant un meilleur pronostic de survie sont souvent associées à une disomie du chromosome 3 et un gain du 6p (Figures II.4 et II.5).

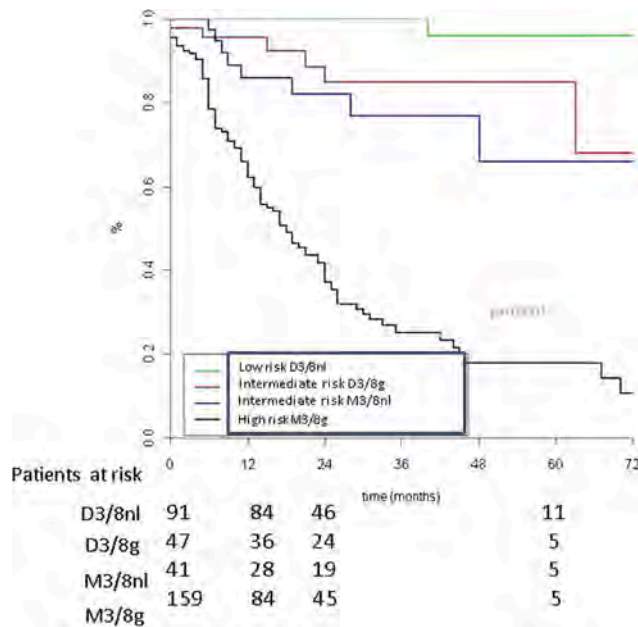


Figure II.4: Courbes de survie Kaplan-Meier selon les statuts des chromosomes 3 et 8.

Analyse de survie Kaplan-Meier montrant le taux de survie sans métastases selon les sous-groupes de tumeurs portant des anomalies sur les chromosomes 3 et 8. M3/8nl (disomie du 3, 8 normal); D3/8g (disomie du 3, gain du 8); M3/8nl (monosomie du 3, 8 normal) et M3/8g (monosomie 3 et gain du 8). Figure et légende d'après (Cassoux et al., 2014).

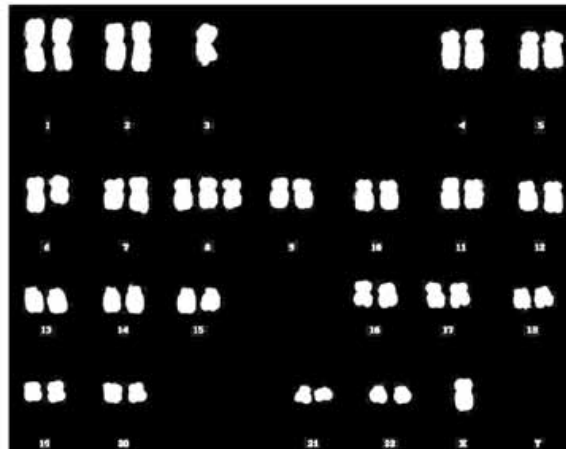


Figure II.5: Les anomalies chromosomiques du mélanome uvéal.

Caryogramme montrant la perte du chromosome 3, l'isodisomie du 6p et le gain du chromosome 8. Figure et légende d'après (Thomas ven der bosch., 2012).

Classification des tumeurs

L'étude de ces anomalies en corrélation avec la survie des patients et le développement de métastases a permis de classer de façon fiable les patients selon différentes catégories. La première catégorie correspond aux tumeurs de mauvais pronostic avec une monosomie du chromosome 3 et un gain du 8q et la seconde catégorie correspond aux tumeurs de bon pronostic présentant une disomie du chromosome 3 et un gain du 6p [171]. Une étude réalisée à l'institut Curie sur une cohorte de tumeurs a confirmé la pertinence de la classification des tumeurs en fonction du statut du chromosome 3 [172].

Bien que la classification des tumeurs se basant sur le statut du chromosome 3 soit fiable, d'autres études ont montrées que cette classification pouvait également être faite en fonction du profil d'expression génique. En effet, l'analyse transcriptomique de 25 tumeurs primaires de mélanome uvéal a permis d'identifier deux groupes de référence selon leur potentiel métastatique : la classe 1 est caractérisée par un faible risque métastatique et la classe 2 est associée à un haut risque métastatique [167]. Cette classification est faite sur la base de l'identification de 62 gènes discriminants entre les deux classes, dont certains sont localisés sur le chromosome 3 et 8. Les 12 gènes les plus discriminants ont été ensuite sélectionnés afin de réaliser des analyses prédictives pour les patients atteints de mélanome uvéal aux Etats-Unis. Ce test est actuellement commercialisé aux Etats-Unis et au Canada sous le nom de DecisionDx-UM [173] (Figure II.6).

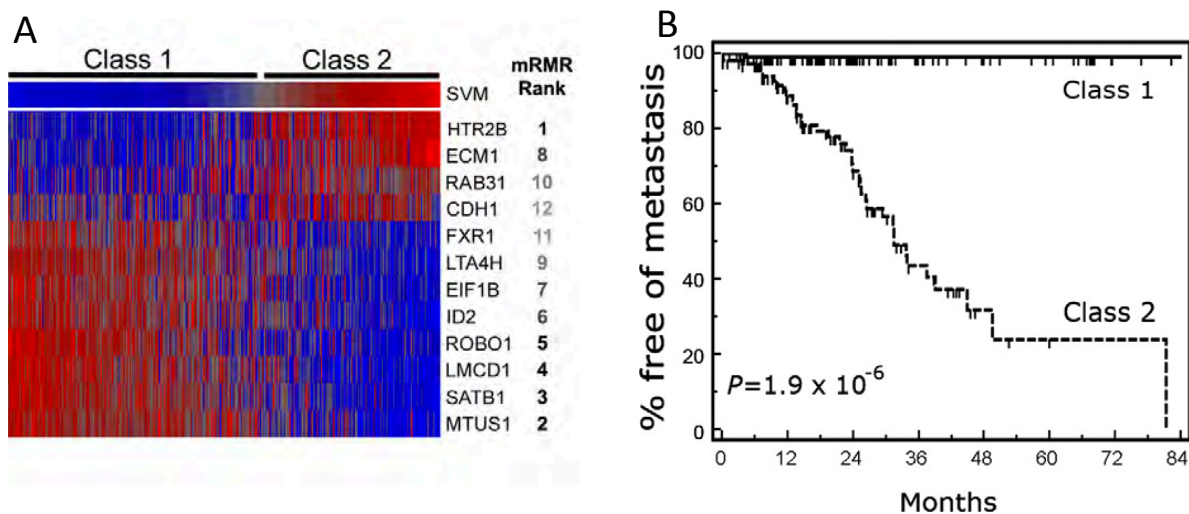


Figure II.6 : Profils d'expression des 12 gènes permettant la prédiction métastatique dans le mélanome uvéal.

A Cartographie montrant l'expression normalisée des 12 gènes qui permettent la discrimination des deux classes de mélanome uvéal. (Bleu: faible expression relative; rouge: haute expression relative; gris: expression intermédiaire).

B Analyse Kaplan-Meier montrant la survie sans métastases en fonction de la catégorisation en classe 1 ou 2 de 172 patients atteints de mélanome uvéal.

Figure et légende adaptée de (Onken et al., 2010).

Altérations des mécanismes moléculaires

Les altérations moléculaires impliquées dans la pathogenèse du mélanome cutané et du mélanome uvéal sont différentes, bien que la voie MAPK soit activée dans les deux types de mélanomes. En plus de la voie MAPK, les voies PI3K, mTOR, Hippo et IGFR sont aussi impliquées dans le mélanome uvéal. De plus, le spectre des mutations du mélanome uvéal est très différent de celui observé dans le mélanome cutané. Alors que les mutations BRAF et NRAS sont spécifiques du mélanome cutané, plus de 80% des tumeurs de mélanome uvéal présentent des mutations dans les gènes GNAQ et GNA11 codant les sous-unités α_q et α_{11} des protéines G respectivement. D'autres mutations initiatrices ont également été découvertes comme PLCB4 et CYSLTR2 qui appartiennent à la même voie de signalisation que GNAQ et GNA11.

La voie de signalisation des MAP Kinases

La voie MAPK pour « Mitogen-Activated Protein Kinases » est une voie de signalisation intracellulaire impliquée dans la régulation de la prolifération, la survie, la différenciation, la migration cellulaire et l'angiogenèse. Elle est anormalement activée dans de nombreux cancers soit par l'activation constitutive de récepteurs membranaires, soit par les mutations somatiques de gènes codant des protéines impliquées dans la voie. La voie MAPK est activée par des stimuli extracellulaires activant des récepteurs à activité tyrosine-kinase ou des récepteurs couplés à des protéines G hétérotrimériques. Après fixation du ligand sur son récepteur, la GTPase Ras est activée par échange du GDP en GTP. Ras-GTP se lie ensuite à la protéine kinase Raf et l'active à son tour. Par la suite, Raf active la kinase MEK par phosphorylation, qui à son tour phosphoryle et active la kinase ERK. ERK va alors, entre autres, pénétrer dans le noyau pour y phosphoryler et activer des facteurs de transcription cibles [174].

Les gènes GNAQ et GNA11 sont mutés dans 83% des tumeurs primaires ou dans les métastases de mélanome uvéal (van Raamsdonk et al., 2010). Ces gènes codent les sous-unités α_q et α_{11} des protéines G couplées à des récepteurs transmembranaires et s'activent par l'échange du GDP en GTP. Les mutations somatiques observées dans les tumeurs de mélanome uvéal affectent majoritairement le codon Q209L (95%) ou le codon R183 (5%). Ces mutations bloquent l'activité GTPase intrinsèque des sous-unités α_q et α_{11} et les rendent constitutivement actives provoquant ainsi l'activation de la voie MAPK [175], [176].

Malgré le rôle commun de GNAQ et GNA11 dans l'activation de la voie MAP Kinase, il semblerait que la mutation de GNA11 ait plus d'impact sur la transformation des mélanocytes. Ceci est suggéré par sa rareté dans les nævi et sa fréquence plus élevée dans les métastases comparée à la mutation GNAQ. De plus, l'injection dans la souris immunodéprimée de mélanocytes mutés GNA11 Q209L induit plus de métastases viscérales que celles de cellules mutées pour GNAQ Q209L, suggérant un rôle oncogénique plus important de GNA11. De même, il a été observé chez les souris mutées pour le gène GNA11 (Dsk7), que la capacité à stimuler la croissance des mélanocytes est plus importante comparée aux souris mutées GNAQ (Dsk1) [175], [177]. Néanmoins, aucune différence sur la survie des patients mutés GNAQ ou GNA11 n'a été observée [175], [176], [178].

La voie MAPK est constitutivement activée dans 86% des tumeurs de mélanomes uvéal [179]. Cependant, bien que la voie MAPK soit également activée dans le mélanome cutané, les gènes et les mutations impliquées dans cette activation sont différents entre les deux types de cancers. En effet, dans le mélanome cutané, l'activation de la voie MAPK est due majoritairement à une mutation activatrice du gène BRAF (V600E) et plus rarement du gène NRAS [179], [180]. Aucun cas de mélanome uvéal présentant une mutation du gène NRAS n'a été rapporté [180] néanmoins quelques cas portant la mutation BRAF ont été rapportés dans le mélanome de l'iris. En effet, Il a été montré que des mutations BRAF étaient présentes dans 50% des mélanomes de l'iris [181].

Ces observations montrent donc d'une part, que l'activation de la voie MAPK dans le mélanome uvéal se produit par un mécanisme différent de celui du mélanome cutané, mais également que l'activation des gènes GNAQ et GNA11 est l'événement majeur qui permet l'activation constitutive de la voie MAPK via la signalisation des protéines G [179], [180], [182]. Le facteur d'échange GTP RasGRP3 a été récemment identifié comme cible en aval des protéines GNAQ et responsable de l'activation de la voie MAPK dans le mélanome uvéal [183].

Les mutations des gènes GNAQ et GNA11 sont également retrouvées dans les nevi [175]. De plus, bien que la mutation GNA11 Q209 soit plus associée aux métastases, les mutations de ces gènes ne permettent pas de distinguer les deux classes de mélanomes uvéaux et ne sont pas associées au pronostic de survie des patients ni au risque métastatique. L'ensemble de ces données montre donc que ces gènes jouent un rôle primordial dans la tumorigenèse dès la transformation des mélanocytes et qu'ils constituent un événement précoce dans le développement du mélanome uvéal.

Des études récentes ont permis de mettre en évidence d'autres mutations impliquées dans l'activation de la voie MAPK dans les 14% des tumeurs ne présentant pas de mutations des gènes GNAQ ou GNA11. Ces mutations concernent les gènes PLCB4 (phospholipase C, beta 4) et CYSLTR2 (Cysteinyl Leukotriene Receptor 2) [184], [185]. La protéine PLCB4 est un effecteur en aval des sous-unités $G\alpha_q$ et $G\alpha_{11}$ qui est activé par interaction directe avec $G\alpha_q$. Cette protéine active la voie MAPK en clivant le PIP2 en PI3 et DAG ce qui stimule PKC. Une mutation gain de fonction de PLCB4 (D630Y) a été identifiée dans certaines tumeurs et se trouve dans le domaine catalytique de la protéine [184]. La protéine CYSLTR2 appartient à une famille de récepteurs transmembranaires couplés aux protéines G (GPCR) qui active la sous-unité $G\alpha_q$ des protéines G. Ce récepteur s'active en réponse à une stimulation par les leucotriènes. Une mutation activatrice L129G a été mise en évidence dans des tumeurs de mélanome uvéal, celle-ci se situe dans une région très conservée de la protéine ce qui provoque son activation constitutive, indépendamment de la stimulation par les leucotriènes, et conduit à l'activation de la voie MAPK [185]. De façon intéressante, dans les tumeurs présentant des mutations des gènes PLCB4 et CYSLTR2 aucune ne présentait des mutations de gènes GNAQ ou GNA11 ce qui suggère que ces mutations sont mutuellement exclusives.

La voie de signalisation Hippo

La voie Hippo agit comme suppresseur de tumeur afin de contrôler l'homéostasie tissulaire ainsi que la taille des organes [186]. La voie canonique passe par une cascade de phosphorylation dépendante des kinases MST1/2 et LATS1/2 qui phosphorylent et inactivent les facteurs de transcription impliqués dans

le contrôle de la prolifération cellulaire YAP et TAZ, en les séquestrant dans le cytoplasme. La phosphorylation de YAP/TAZ conduit également à sa polyubiquitination et sa dégradation par le protéasome. Ainsi, quand la voie Hippo est activée, la transcription des gènes cibles de YAP est réprimée. En revanche, lorsque la voie est inactive, la cascade de phosphorylation n'a pas lieu, YAP/TAZ sont transloqués dans le noyau où ils interagissent avec TEAD et entraînent la transcription des gènes cibles. La dérégulation de la voie Hippo est observée dans de nombreux types de cancers humains [187]–[189].

En plus d'activer la voie MAP Kinases, les mutations activatrices de GNAQ et GNA11 activent aussi la voie Hippo [190]. En effet, il a été montré dans différentes lignées cellulaires de mélanome uvéal, que YAP et TAZ étaient moins phosphorylés et par conséquent accumulés dans le noyau des cellules mutées GNAQ/GNA11. De même, il y a une forte corrélation entre le statut muté de GNAQ/GNA11 et la localisation nucléaire de YAP dans des tumeurs primaires de mélanome uvéal. De plus, l'inhibition de l'expression de GNAQ par ARN interférence dans une lignée de mélanome uvéal 92.1 possédant une mutation activatrice dans GNAQ induit une augmentation de la phosphorylation de YAP et par conséquent une diminution de son accumulation dans le noyau de ces cellules. Enfin, l'inhibition de YAP par ARN interférence dans des cellules de mélanome uvéal mutées pour GNAQ ou GNA11 greffées en sous-cutané chez des souris immunodéficientes montre une réduction de la croissance tumorale comparée aux cellules contrôles [191].

Il existe également une voie non canonique permettant l'activation de YAP indépendamment de MST1/2 et de LATS1/2 [192]. En effet, il a été montré que les protéines Gαq/Gα11 mutées étaient capables d'activer TRIO qui à son tour activait RhoA et Rac1 et induisait ainsi la polymérisation de filaments d'actine. Ces filaments d'actine entraînent la dissociation entre AMOT et YAP qui peut ainsi être transloqué dans le noyau et activer la transcription de ses gènes cibles.

La voie de signalisation PI3 Kinase

Les PI3K (Phosphoinositide 3-Kinases) forment une famille de kinases qui catalysent la phosphorylation du groupement hydroxyl situé en position 3' du cycle Inositol pour former des 3' phosphoinositols. Elle catalyse ainsi la formation du PI(3,4,5)P3 à partir du PI(4,5)P2. Le PI(3,4,5)P3 est un acteur essentiel de la prolifération, de la différenciation, de la survie, de la migration et du trafic vésiculaire. L'activation de la PI3K, par des récepteurs à activité tyrosine kinase ou par les protéines Ras de la voie MAPK, induit l'activation de la kinase effectrice Akt/PKB [193]–[195]. Akt est recruté par le PI(3,4,5)P3 à la membrane plasmique ou elle est phosphorylée par PDK1, une fois activée elle va pouvoir, à son tour, activer ses cibles impliquées dans la prolifération et la survie cellulaire.

L'activation constitutive d'Akt a été montrée dans différentes lignées (92.1, Mel270, OCM-1, TP31) et tumeurs de mélanome uvéal [196], [197]. De plus, l'inhibition de la PI3K par un inhibiteur commercial (LY294002) réduit la prolifération de cellules de mélanome uvéal (92.1 et Mel 270) de manière dose dépendante. Ce résultat suggère une action combinée de la voie MAPK et PI3K dans la prolifération du mélanome uvéal [196], [197].

Il a également été montré que la signalisation PI3K est impliquée dans la pathologie du mélanome uvéal à travers la diminution ou la perte totale de l'expression de PTEN [198]. En effet, PTEN inhibe la voie PI3K

en déphosphorylant le PI(3,4,5)P3 en PI(3,4)P2 ce qui empêche l'activation de Akt [199],[200]. Une diminution ou une absence de l'expression de PTEN dans les tumeurs de mélanome uvéal les plus agressives comparée aux tumeurs les moins agressives a été mise en évidence [198]. Cette diminution a été observée dans 60% (44/75 TP) des tumeurs de mélanome uvéal étudiées et serait associée à un mauvais pronostic et influencerait la survie des patients. En effet, les patients présentant une perte totale de l'expression de PTEN ont une survie moyenne de 60 mois alors que les patients ayant une expression proche de la normale ont une survie de 120 mois. La diminution ou absence d'expression de PTEN serait due à une microdélétion du chromosome 10 abritant le gène PTEN qui est en position 10q23.3 [198]. La diminution de l'expression de PTEN est également associée à une tendance élevée pour l'aneuploïdie. Ces observations suggèrent donc que PTEN pourrait jouer un rôle dans les étapes tardives de la tumorigénèse du mélanome uvéal et dans la classification des tumeurs de mauvais pronostic.

Parmi les effecteurs en aval de PI3K, mTOR (mammalian Target Of Rapamycin), qui est activé par Akt, joue un rôle important dans la stimulation de la prolifération cellulaire en contrôlant des régulateurs de la progression du cycle cellulaire. La kinase mTOR est activée dans des lignées de mélanome de la choroïde et son inhibition par la rapamycine induit une augmentation de la phosphorylation de Akt et l'activation consécutive de la cycline D1 par GSK3 β [196], [201], [202]. Il a également été montré que l'activation de la cycline D1 dans les cellules de mélanome choroïdien nécessite l'activation de la voie PI3K mais aussi celle de BRAF/ERK quel que soit le statut de mutation de BRAF [196].

La **Figure II.7** présente un schéma des voies de signalisation impliquées dans le mélanome uvéal.

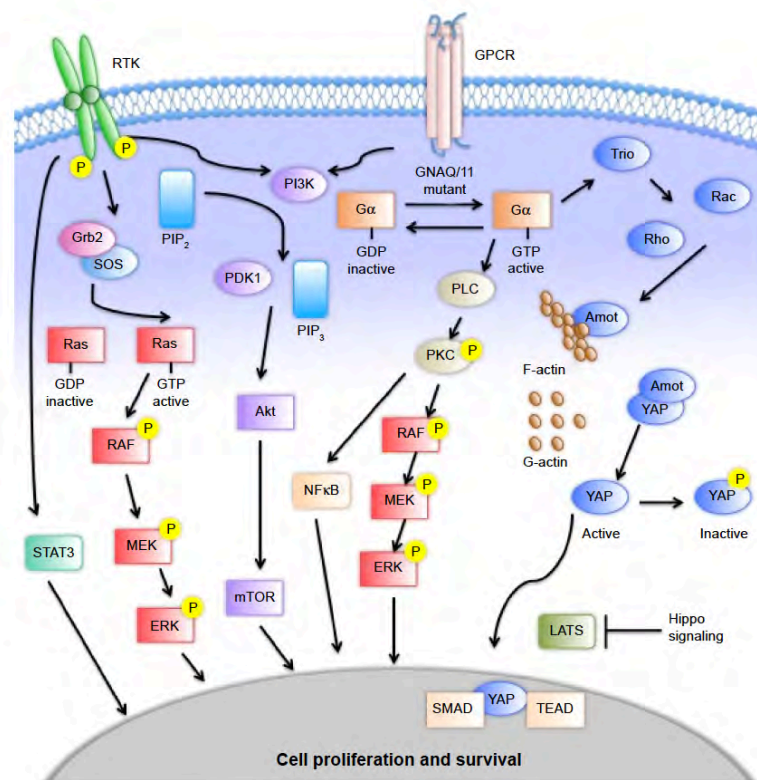


Figure II.7: Voies de signalisation impliquées dans le mélanome uvéal.

Les voies MAPK, PI3K/AKT/mTOR, Hippo sont impliquées dans la tumorigenèse du mélanome uvéal. Les protéines G α sont activées en réponse de la fixation d'un ligand sur le récepteur couplé aux protéines G (GPCR): CYSLTR. L'activation des protéines G α assure la catalyse du GDP en GTP permettant ainsi leur activation et le clivage du PIP2 en PIP3 et DAG par PLC β . DAG active ensuite la protéine kinase C PKC. La voie MAPK est activée en réponse de la stimulation de PKC. La voie Hippo est activée par la protéine TRIO en aval de la protéine G α q. Le PIP3 active la voie AKT qui favorise la croissance tumorale. pERK et pAKT activent mTOR qui favorise également la croissance tumorale. Les acteurs entourés sont mutés dans les tumeurs du mélanome uvéal et conduisent l'activation de la voie MAPK.

Abréviations: PIP2: phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate; PIP3: phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate; G α :G-protein alpha subunit; GDP: guanosine diphosphate; GPCR: récepteur couplé au protéine G; GTP: guanosine triphosphate; P: phosphate; RTK: récepteur tyrosine kinase.

Figure et légende d'après (Luke et al. 2014).

Mutations perte de fonction de BAP1

BAP1 (BRCA1 associated protein-1) est un gène suppresseur de tumeur qui code une ubiquitine carboxyl hydrolase localisée dans le noyau où elle régule de nombreux processus cellulaires tels que : la conformation de la chromatine [203], la transcription [204], [205], le cycle cellulaire [206], la réponse aux dommages à l'ADN [207], la différenciation cellulaire et le développement embryonnaire [208].

Le gène codant BAP1 est localisé sur le chromosome 3p21.1. Une copie du gène est donc perdue dans les tumeurs de mélanome uvéal ayant une monosomie du chromosome 3 (tumeurs de classe 2). De plus, l'analyse de génome par séquençage de l'ADN a montré que 80% des tumeurs de classe 2 possédaient des mutations inactivatrices sur le gène BAP1 restant [209]. En revanche, ces mutations sont peu retrouvées dans les tumeurs de classe 1. Les mutations de BAP1 sont donc fortement associées à la monosomie du chromosome 3 et sont retrouvées dans 40% de l'ensemble des tumeurs [209]. Une étude récente a montré que la perte d'une des copies du chromosome 3, conduisant à la monosomie, se produisait avant la mutation de BAP1, et ces deux événements se produisent également avant l'apparition d'autres mutations sur le chromosome 3 ou d'autres altérations génomiques [210].

La perte de l'expression de BAP1 dans des cellules de mélanome uvéal 92.1 entraîne la dérégulation de l'expression de nombreux gènes impliqués dans le contrôle du cycle cellulaire, la réplication de l'ADN, le métabolisme, la survie ou l'apoptose [211]. Parmi ces gènes, CDH1 (codant la E-cadhérine) et kit (proto-oncogène) sont surexprimés tandis que SOX10, CTNnb1 et EDNRB (impliqués dans la différenciation des mélanocytes) et ROBO1 (impliqué dans la différenciation de la crête neurale) sont sous-exprimés [209]. La dérégulation de BAP1 aboutirait donc à la promotion de la tumorigenèse et du développement métastatique par la dérégulation de l'expression de ces gènes cibles.

Mutations de SF3B1

Le gène SF3B1 est localisé en 2q33.1. Il code pour la sous-unité 1 du complexe d'épissage 3b qui est un composant des petites ribonucléoprotéines nucléaires U2 (snRNP U2) et U12 (snRNP U12). Celles-ci participent à l'épissage des pré-ARNm. SF3B1 serait également impliqué dans le mécanisme de

réparation des dommages à l'ADN [212]. La mutation de ce gène sur l'arginine R625 est retrouvée dans environ 20% des tumeurs de mélanome uvéal [213], [214]. Il s'agit de la mutation prédominante retrouvée dans les tumeurs [214], cependant la conséquence de cette mutation sur le rôle de SF3B1 n'est pas claire mais ne semble pas liée à un défaut d'épissage [214]. Il existe également des mutations faux-sens de SF3B1 qui provoquent un défaut d'épissage des ARN cibles [215], [216].

La plupart des tumeurs mutées SF3B1 sont des tumeurs de classe 1 (bon pronostic). Une étude récente a montré que les tumeurs avec une disomie du chromosome 3 (classe 1) et mutées SF3B1 étaient de moins bon pronostic métastatique que les tumeurs non mutées SF3B1, avec des métastases qui se développaient plus de 5 ans après le diagnostic (23-145 mois) [217]. SF3B1 apparaît donc comme un facteur de pronostic intermédiaire entre les tumeurs de mauvais pronostic (classe 2) et celles de meilleur pronostic (classe 1) portant la mutation EIF1AX. Ce pronostic intermédiaire s'explique par le fait que les patients portant la mutation SF3B1 développent des métastases mais celles-ci apparaissent plus tardivement que les patients ayant des tumeurs de classe 2 [217].

Mutations de EIF1AX

Le gène EIF1AX (Eukaryotic Translation Initiation Factor 1A) est localisé sur le chromosome X en Xp22. Il code un facteur d'initiation de la traduction chez les Eucaryotes qui stimule le transfert de l'ARNt-Mét initiateur sur la sous-unité ribosomale 40S. Ce gène a été retrouvé muté dans environ 20% des tumeurs de mélanome uvéal [213], [218]. Les mutations d'EIF1AX sont de bon pronostic. En effet, elles sont souvent identifiées dans les tumeurs ayant une disomie du 3 (bon pronostic) et sont rares dans les tumeurs ayant une monosomie du 3 [219]. Toutes les mutations retrouvées sont des substitutions ou courtes délétions d'un ou deux acides aminés dans la partie N-terminale de EIF1AX et n'affectent pas la surface d'interaction avec l'ARN [220]. L'action des mutations de EIF1AX n'est pas encore élucidée dans le mélanome uvéal. Néanmoins, il a été montré que des mutations de la partie N-terminale de EIF1AX, qui est conservé chez les Eucaryotes, induisant un défaut de traduction générale chez la levure. Il a donc été proposé que ces mutations ont la même conséquence dans les cellules de mélanome uvéal [218], [221]. Enfin, il a été montré que les mutations de SF3B1 et EIF1AX sont mutuellement quasiment exclusives, suggérant l'incompatibilité de ces mutations au sein de la même tumeur [222].

Expression de l'antigène PRAME

L'antigène PRAME (« Preferentially expressed antigen of melanoma ») est surexprimé dans de nombreux cancers (mélanome cutané, carcinome du sein, cancer du poumon, leucémies). Dans le mélanome uvéal, l'expression de PRAME est associée à un risque métastatique plus élevée aussi bien dans les tumeurs de classe 1 et les tumeurs de classe 2 [223]. Dans les tumeurs de classe 1, l'expression de PRAME est associée aux mutations de SF3B1 [224]. La combinaison de l'expression de PRAME et des mutations de SF3B1 semble contribuer à l'apparition de métastases tardives dans les tumeurs de classe 1 [225], tandis que les tumeurs de classe 2 qui expriment PRAME montrent une progression métastatique plus rapide [224].

La **Figure II.8** présente un schéma modèle de la progression du mélanome uvéal.

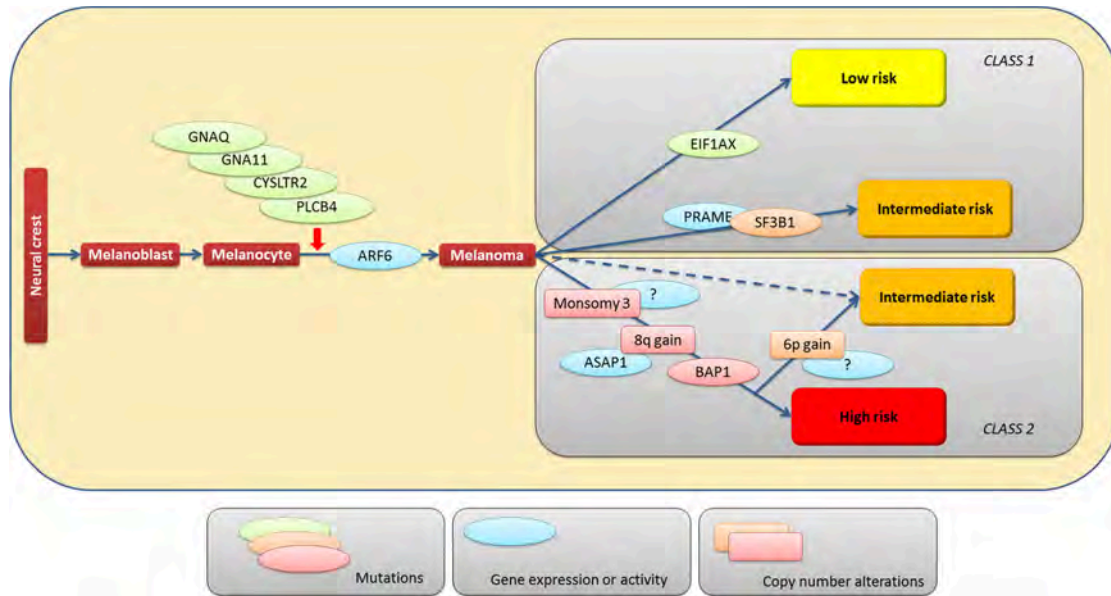


Figure II.8 : Modèle de progression de la tumorigenèse du mélanome uvéal.

Le mélanome uvéal se développe par la transformation des mélanoblastes ou mélanocytes puis est initiée, dans la plupart des cas par des mutations activatrices dans les gènes GNAQ ou GNA11, ou encore par CYSLTR2 ou PLCB4. Les mutations de ces quatre gènes conduisent tous à l'activation de la voie MAPK. Un médiateur fonctionnel important de ces mutations est la protéine ARF6 qui est activée. Ensuite apparaissent les mutations qui influencent la progression métastatique. La perte d'une copie du chromosome 3, les mutations du gène suppresseur de tumeur BAP1 qui est localisé sur ce même chromosome et l'amplification du 8q mènent à un haut risque métastatique. Ce risque peut être atténué par l'amplification concomitante du gain du 6p. Les risques intermédiaires sont observés dans le cas d'une disomie du chromosome 3, ou d'un chromosome normal tous deux accompagnés de la présence de mutations sur le gène SF3B1. Les mutations dans EIF1AX et l'absence d'une des mutations précédentes sont associées à un faible risque métastatique. Figure et légende d'après (Amaro et al., 2017).

Une étude récente a montré que les mutations et les altérations chromosomiques du mélanome uvéal apparaissent précocement au cours du développement tumoral puis est suivie d'une phase de stagnation, contrairement au mélanome cutané où les mutations apparaissent de façon progressive en suivant une évolution graduelle avec des altérations chromosomiques qui apparaissent relativement tardivement [226]. Cette différence pourrait ainsi expliquer pourquoi la tumeur primaire a souvent disséminée au moment du diagnostic [119] et pourquoi les traitements plus agressifs contre la tumeur primaire n'augmentent le taux de survie.

Nouvelle classification des tumeurs en 4 sous-groupes

Une étude récente, reposant sur l'analyse de 80 tumeurs de mélanome uvéal, a permis de subdiviser chacune des deux classes de tumeurs en quatre sous-groupes distincts (Figure II.9). En effet, deux sous-

groupes sont associés aux tumeurs de mauvais pronostic présentant une monosomie du chromosome 3 (classe 2) et les deux autres sont associés aux tumeurs de bon pronostic présentant une disomie du chromosome 3 (classe 1). Cette répartition se base sur l'analyse combinée des aberrations chromosomiques, des mutations génétiques, du profil de méthylation et du profil de transcription des ARNm, miARN et lncARN (long ARN non codant) [210].

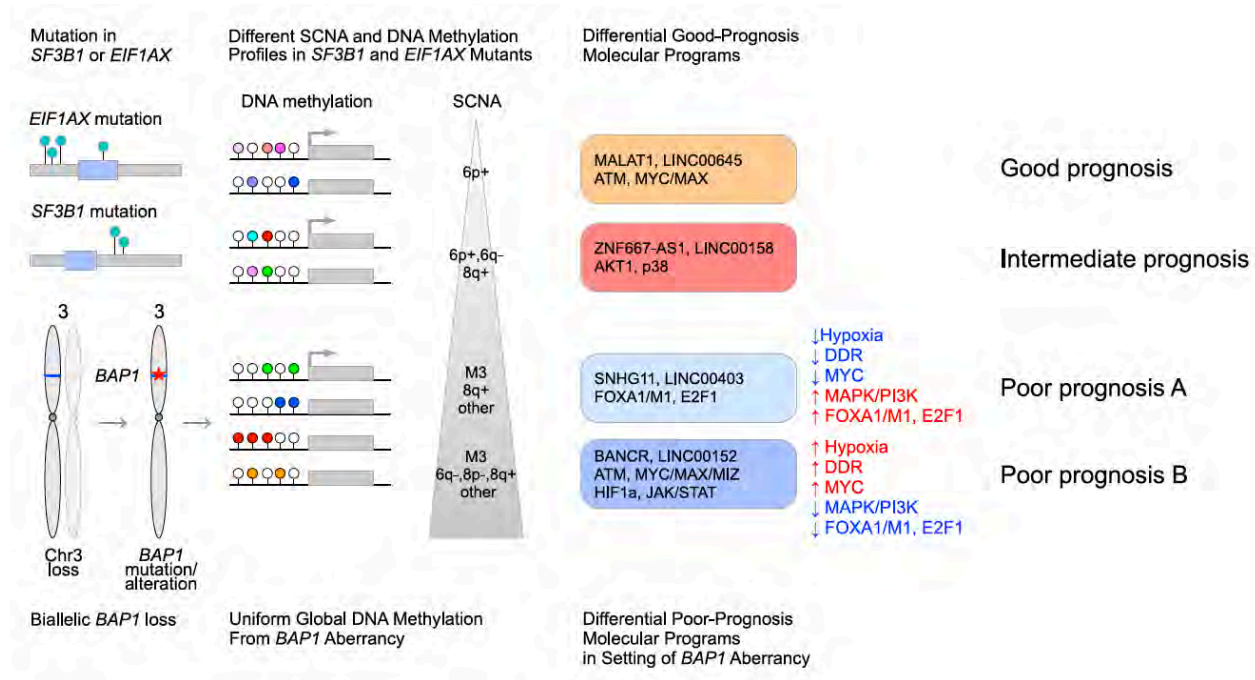


Figure II.9 : Séparation des deux classes de tumeurs en deux sous-groupes distincts.

Schématisation des deux sous-groupes issus des tumeurs de classe 1 (disomie du 3) et des tumeurs de classe 2 (monosomie du 3).

Les tumeurs ayant une disomie du 3 (classe 1) se distinguent entre les tumeurs mutées EIF1AX et celles mutées SF3B1, qui sont associées respectivement à risque métastatique faible et intermédiaire. Ces deux sous-groupes diffèrent par leur état de méthylation et les altérations du nombre de copies de l'ADN génomique.

Les tumeurs ayant une disomie du 3 (classe 2) se distinguent également par des différences du profil de transcription (ARNm, lncARN, miARN), des altérations du nombre de copies de l'ADN génomique et d'activation de voies de signalisation (hypoxie, réparation des dommages à l'ADN, voie Myc/Max et prolifération).

Figure et légende adaptée de (Robertson et al., 2017).

Tout d'abord, cette étude confirme les aberrations chromosomiques précédemment identifiées entre les deux classes de tumeurs. De même, les mutations EIF1AX et SF3B1 fortement associées aux tumeurs présentant une disomie du chromosome 3 sont également retrouvées. Mais l'étude va plus loin en montrant que la perte de BAP1 à la suite de la monosomie du 3 corrèle avec un état de méthylation de l'ADN qui diffère de celui des tumeurs ayant une disomie du chromosome 3. De plus, Les lncARN CYTOR (LINC00152), BANCR et PVT1, connus pour être associés au cancer, sont plus abondants dans les tumeurs de mauvais pronostic. L'augmentation de l'expression de CYTOR corrèle avec la migration, l'invasion et la

prolifération tumorale [227] Son action oncogène passe notamment par la stabilisation de la protéine Myc [228].

Les 2 sous-groupes de tumeurs ayant une disomie du chromosome 3 se répartissent entre celles mutées EIF1AX et celles mutées SF3B1, chaque sous-groupes (1 et 2 respectivement) ayant des profils de méthylation de l'ADN ainsi que des aberrations génomiques différentes. En effet, le sous-groupe 1 présente moins d'aneuploïdie et montre un gain total ou partiel du 6p mais aucune autre aberration chromosomique. Le sous-groupe 2 montre, en plus du gain du 6p, un gain partiel du 8q. De plus, la méthylation de l'ADN est enrichie dans le sous-groupe 2. Ces différences permettent d'associer le sous-groupe 1 à un bon pronostic de survie/risque métastatique faible et le sous-groupe 2 à un pronostic de survie/risque intermédiaire [210].

Les 2 sous-groupes (3 et 4) de tumeurs ayant une monosomie du 3 divergent par les aberrations génomiques et leur profil de transcription. Bien que le gain du 8q soit observé dans les deux sous-groupes, d'autres altérations génomiques ne sont observées uniquement dans le sous groupe 4 telles que la présence d'isochromosome 8. De plus, Les lncARN NEAT1 et MALAT1 sont surexprimés dans le sous-groupe 3 par rapport au 4, de même que les miARN 199a-3p/5p, 199b-3p, et let-7b-5b. En revanche, les miARN 142, 150, 21, 29b, 146b et 155 sont plus abondants dans le sous-groupe 4. Certains des lncARN et mARN corrént avec certaines aberrations génomiques et/ou le profil de méthylation. Bien que les sous-groupes 3 et 4 partagent le même profil de méthylation de l'ADN, les voies de signalisation activées dans les deux sous-groupes sont différentes. En effet, le sous-groupe 4 est caractérisé par une activation plus importante des voies de réparations aux dommages à l'ADN, de la voie Myc et HIF1a et de la réponse à l'hypoxie. De plus, on observe une activation plus importante de facteurs de transcription impliqués dans l'immunité tels que JAK2-STAT1/3 et Jun-Fos. Tandis que le sous-groupe 3 est caractérisé par une activité plus importante des facteurs de transcription FOXA1 et FOXM1 et de la voie MAPK et Akt. Ainsi, le sous-groupe 3 est associé à un pronostic de survie/risque intermédiaire et le 4 à un mauvais pronostic de survie /risque élevé [210].

Développement de thérapies pour les métastases du mélanome uvéal

Comme décrit précédemment, le mélanome uvéal est un cancer agressif puisque malgré le traitement de la tumeur primaire, jusqu'à 50% des patients meurent à la suite du développement de métastases hépatiques et le délai de survie médian après apparition des métastases est d'environ 6 mois. De plus, il n'existe actuellement pas de traitement efficace pour soigner les métastases et ainsi améliorer la survie des patients puisque aucune thérapie systémique n'a encore démontré de résultats efficaces sur le devenir des patients. Bien que le traitement des métastases par résection chirurgical semble efficace et permette d'augmenter le taux de survie, cette technique n'est malheureusement applicable que pour une minorité de patients (moins de 10% des patients) [219].

Bien que des différences moléculaires existent entre le mélanome cutané et le mélanome uvéal, des traitements ayant montrés leur efficacité dans le mélanome cutané ont été testés dans le mélanome uvéal. Ces traitements (dacarbazine, temozoline, cisplatine, treosulfan, fotemustine....) ont tous montrés des résultats décevants sur la survie des patients.

Thérapies adjuvantes

De nouvelles thérapies, appelées thérapies adjuvantes, visant à prévenir l'apparition de métastases après traitement de la tumeur primaire sont étudiées. Les récepteurs de facteurs de croissance Met et Kit sont hautement exprimés dans les tumeurs de mélanome uvéal [229], [230].

Le Crizotinib est un inhibiteur de tyrosine kinase qui inhibe la phosphorylation de Met ainsi que la migration *in vitro* des cellules de mélanome uvéal. Le Crizotinib réduit de façon significative le développement de métastases dans un modèle murin. Cependant, il n'est pas suffisant pour inhiber la croissance de la tumeur ce qui suggère que d'autres récepteurs de tyrosines kinases, tels que EGFR et IGFR1, sont critiques dans la prolifération cellulaire et la survie des cellules de mélanome uvéal [231], [232].

Le Sunitinib, un autre inhibiteur de tyrosine kinase qui inhibe Kit et VEGFR, a montré un gain de survie à 5 ans (75% au lieu de 55%). Le Crizotinib ainsi que le Sunitinib sont tous les deux en cours d'étude comme traitement adjuvant du mélanome uvéal (NCT02223819, NCT02068586) [233].

La perte de BAP1 est associée à la perte de la différenciation des mélanocytes et une augmentation du potentiel métastatique dans le mélanome uvéal. Les inhibiteurs de l'histone déacétylase (HDAC) sont capables de contrer les effets de la perte de BAP1 en induisant une différenciation morphologique des mélanocytes passant ainsi de haut risque à faible risque métastatique [234]. L'acide valproïc et le vorinostat, basés sur le rôle potentiel de l'inhibition de HDAC, sont des traitements adjuvants en cours d'essais cliniques (NCT02068586, NCT01587352).

D'autres molécules sont également étudiées comme traitement adjuvant en se basant sur d'autres mécanismes biologiques du mélanome uvéal [144]. Le **Tableau II.2** montre les différents essais cliniques adjuvants en cours.

Mechanism	Trial	Phase	Identifiant	Status
Chemotherapy	Dacarbazine + interferon-alfa	II	NCT01100528	Accrual complete
	Cisplatine, tamoxifène + sunitinib	II	NCT00489944	Unknown
	Fotémustine <i>versus</i> observation	III	EudraCT Number 2008-005691-27	Accrual complete
Targeted therapy	Crizotinib	II	NCT02223819	Recruiting
	Sunitinib <i>versus</i> valproïc acid	II	NCT02068586	Recruiting
Immunotherapy	Ipilimumab + nivolumab	II	NCT01585194	Recruiting
	Dendritic cell vaccine	I/II	NCT00929019	Recruiting
Liver-directed therapy	Prophylactic liver RT	II	NCT02336763	Terminated*

*Study terminated due to lack of accrual.

Tableau II.2 : Traitements adjuvants actuellement en essais clinique contre le mélanome uvéal.
Tableau d'après (Yang et al., 2018).

Immunothérapies

Bien que jusqu'à présent l'immunothérapie n'ait pas montré de résultats convaincants dans le traitement des métastases du mélanome uvéal [235], d'autres immunothérapies sont en cours d'études notamment sur l'investigation des lymphocytes infiltrants la tumeur ou bien sur l'IMCgp100, une molécule bispécifique immuno-thérapeutique qui cible le gp100 et le complexe CD3 des lymphocytes T. IMCgp100 augmente l'affinité et l'activation des lymphocytes T CD8+ cytotoxique contre les cellules tumorales qui expriment le peptide gp100 [236], [237]. La phase I de l'essai (NCT02570308) a montré des résultats favorables avec un rétrécissement de la tumeur chez les patients atteints de mélanome uvéal et la phase II est en cours (NCT03070392).

Le renforcement du système immunitaire est également étudié dans un but thérapeutique. Bien que les lymphocytes infiltrant (TILs) dans les métastases hépatiques ont montré une réactivité anti-tumorale plus faible dans le mélanome uvéal comparée au mélanome cutané [238], une étude de phase II visant à établir la capacité de régression tumorale des TILs dans le mélanome uvéal a été réalisée (NCT01814046). Celle-ci a montré des résultats encourageants avec une régression tumorale chez 35% des patients (et 15% des patients commençant à montrer une régression au moment du rapport).

Un essai clinique en phase II combinant le Nivolumab (anticorps monoclonal dirigé contre la protéine PD-1 (programmed cell death protein 1)) et le Ipilimumab (anticorps monoclonal dirigé la protéine CTLA-4 (cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4)) (NCT01585194) est également en cours dans le mélanome uvéal métastatique. Le mode d'action de ces deux médicaments consiste à inhiber PD-1 et CTLA-4 respectivement qui sont deux protéines qui bloquent l'activation des lymphocytes T. Le Nivolumab et le Ipilimumab disposent chacun d'une autorisation de mise sur le marché aux Etats-Unis et en Europe contre le mélanome métastatique y compris le mélanome uvéal.

Le Pembrolizumab est, de même que le Nivolumab, un inhibiteur de PD-1 actuellement en essai clinique de phase II dans le mélanome uvéal.

Le Glematumumab vedotin est un anticorps monoclonal conjugué dirigé contre la glycoprotéine NMB, protéine transmembranaire surexprimée dans de nombreux cancers dont le mélanome uvéal. Les résultats des essais de la phase II (NCT02363283) montrent que ce traitement a permis de stabiliser le développement métastatique chez 61% des patients mais a été inefficace chez les 39% de patients restants [144].

L'antigène PRAME, qui est un marqueur pronostic connu associé aux tumeurs de classe 1 qui métastasent [224], a été également proposé comme cible thérapeutique étant donné qu'il n'est pas exprimé dans les cellules saines. Il a été montré que PRAME est exprimé dans 69% des tumeurs de mélanome uvéal [239] et que des lymphocytes T reconnaissant spécifiquement PRAME étaient capables de réagir contre les cellules de mélanome uvéal PRAME-positives. Des essais de vaccins ciblant PRAME sont en cours dans le mélanome cutané (NCT01149343) et le cancer du poumon (NCT01853878) et sont envisagés pour le mélanome uvéal.

Thérapies ciblées

La connaissance des altérations génétiques et moléculaires du mélanome uvéal a permis le développement de thérapies qui ciblent plus spécifiquement les molécules et/ou voies de signalisation impliquées dans le mélanome uvéal. Certaines thérapies ciblent, par exemple, la voie MAPK au niveau de MEK et PKC, la voie PI3K/Akt ou bien la voie mTOR qui sont des voies activées dans les tumeurs. Malheureusement, jusqu'à présent les résultats de ces traitements sont décevants avec un taux de réponse inférieur à 10%.

Le Selumetinib est un inhibiteur hautement sélectif et puissant de MEK qui montre de meilleurs résultats cliniques comparés à la chimiothérapie (temozolomide ou dacarbazine) [240]. Après des résultats prometteurs en phase II (temps de survie sans métastases significativement augmenté chez les patients ayant reçus le Selumetinib comparé à ceux traités par chimiothérapie (15,9 contre 7 semaines $p < 0,001$) et taux de réponse de 14% pour le Selumetinib contre 0% pour la chimiothérapie) la phase III a, en revanche, donné des résultats décevants (pas de différence du temps de survie sans métastases ni du taux de réponse). Des efforts sont donc réalisés actuellement afin d'optimiser l'efficacité de traitement via l'inhibition de MEK.

Le Trametinib est un autre inhibiteur de MEK qui a été testé en phase I et a permis une réduction de la tumeur chez 13% des patients et une stabilisation chez 24% des patients pendant plus de 16 semaines [241]. Le Trametinib en combinaison avec le Dabrafenib est approuvé aux Etats-Unis dans le traitement du mélanome cutané.

Etant donné que les mutations GNAQ/GNA11 activent simultanément MEK et Akt, l'inhibition de ces deux voies de signalisation semble une approche prometteuse. Le Selumetinib combiné avec l'inhibiteur d'Akt MK2206 induit une diminution synergique de la viabilité des cellules de mélanome uvéal mutées GNAQ et inhibe la croissance tumorale dans un modèle de xénogreffe de souris [242]. Malheureusement, une étude de phase II évaluant l'efficacité du Trametinib avec ou sans inhibiteur d'Akt GSK795 n'a pas permis de mettre en évidence un bénéfice de survie des patients avec le GSK795.

D'autres molécules, visant à inhiber la voie MAPK via l'inhibition de PKC sont également testées à l'Institut Curie (sotrastaurin, LXS196) (NCT02601378). De même, l'inhibition combinée de PKC et PI3K est aussi investiguée (sotrastaurin et BYL719). Les résultats de la phase Ib (NCT02273219) montrent une stabilisation de la tumeur chez 67% des patients avec un temps de survie sans métastases supérieur médian de 7,6 semaines mais pas de régression tumorale n'a été observée [243].

L'investigation, sur des modèles murins de xénogreffes de mélanome uvéal, d'un large panel de différentes combinaisons possibles entre un inhibiteur de PKC AEB071 et plusieurs autres types d'inhibiteurs, a également été réalisée à l'Institut Curie. Les combinaisons entre l'inhibiteur PKC AEB071 et CGM097 (inhibiteur de p53-MDM2), ainsi que PKC AEB071 et l'inhibiteur de mTORC1 RAD001 montrent les meilleurs résultats avec une régression du volume tumoral. Les études *in vitro* de ces deux associations confirment l'efficacité de leurs activités combinées et leur capacité à induire la mort cellulaire. Ces résultats suggèrent que les combinaisons des inhibiteurs de PKC, mTOR et p53-MDM2 est une approche thérapeutique efficace qui pourrait fournir des résultats significatifs sur le devenir des patients [244].

Le Sorafenib qui est un autre inhibiteur multi-kinases dont l'efficacité sur la croissance tumorale a été démontré dans le carcinome à cellules rénales et de l'hépatocarcinome. Les études précliniques montrent une inhibition de la phosphorylation de ERK et une diminution de la prolifération des cellules de mélanome uvéal. Le Sorafenib a été testé en étude de phase II discontinuée et a montré une réponse partielle chez 1,3% des patients mais une progression tumorale chez 24% des patients. Une stabilisation tumorale a été observée chez 51% des patients ayant reçu le Sorafenib de façon continue ou discontinuée. Le traitement de façon continu est associé à une augmentation significative du temps de survie sans métastases comparé au placebo (5,5 contre 1,9 mois, $p=0,0079$) ce qui suggère que le traitement a une activité clinique malgré le taux de réponse très faible [245].

Approches épigénétiques

Les dérégulations épigénétiques jouent un rôle important dans la pathogénicité du mélanome uvéal. Les gènes codant des régulateurs épigénétiques sont sous-exprimés dans les tumeurs à haut risque métastatique [246]. De plus, comme décrit précédemment, les tumeurs de mauvais pronostic associées à une monosomie du chromosome 3 et à une perte de BAP1 possèdent un profil de méthylation de l'ADN spécifique [210]. La famille de protéines BET (Bromodomain and Extra-Terminal) incluant BRD2, BRD3, BRD4 et BRDT sont des régulateurs épigénétiques qui s'associent aux résidus lysines acétylés sur les queues des histones pour permettre l'assemblage de complexes nucléaires qui régulent la réplication de l'ADN, le remodelage de la chromatine et la transcription [247], [248]. Plus spécifiquement, BRD4 régulerait la transcription de Myc, dont l'amplification joue un rôle important dans le mélanome uvéal. Les inhibiteurs de BET pourraient donc avoir un intérêt thérapeutique en sous-exprimant Myc et l'ensemble de ces gènes cibles.

La première génération d'inhibiteur des BET, JQ1, qui empêche l'acétylation des histones par BRD4 a montré une activité cytotoxique sur les lignées cellulaires mutées GNAQ/GNA11 et sur un modèle de mélanome uvéal murin [249]. De façon intéressante, l'effet anti-tumoral de l'inhibition des BET semble être médié par la suppression de Bcl-xl et Rad51, régulateurs de l'apoptose et de la réparation des dommages à l'ADN respectivement. L'inhibition de Bcl-xl et Rad51 est suffisante pour induire l'apoptose dans les cellules de mélanome uvéal indépendamment de Myc [249]. La molécule PLX51107, inhibiteur des BET, est actuellement en étude de phase Ib sur différentes tumeurs dont le mélanome uvéal (NCT02683395). En se basant sur les résultats précliniques prometteurs et les premiers signes cliniques dans le mélanome uvéal, une étude de phase II chez les patients atteints de mélanome uvéal métastatique est planifiée.

Le **Tableau II.3** montre les différents essais cliniques ciblant les métastases du mélanome uvéal.

Mechanism	Trial	Phase	Identifier	Status
Targeted therapy				
PKC/MEK	AEB071 + BYL719	I	NCT02273219	Accrual complete
	Intermittent selumetinib	I	NCT02768766	Recruiting
	Selumetinib +/- paclitaxel	II	ISRCTN29621851	Recruiting
	<i>Binimetinib + AEB071*</i>	I/II	<i>NCT01801358</i>	<i>Terminated</i>
	LXS196	I	NCT02601378	Recruiting
Multikinase inhibition	Sorafenib (STREAM)	II	NCT01377025	Accrual complete
	Cabozantinib <i>versus</i> temozolomide/ dacarbazine	II	NCT01835145	Accrual complete
Immunotherapy				
Checkpoint blockade	Pembrolizumab	II	NCT02359851	Accrual complete
	Ipilimumab + nivolumab	II	NCT01585194	Recruiting
	Ipilimumab + nivolumab	II	NCT02626962	Accrual complete
	<i>Ipilimumab + radioembolization*</i>	I	<i>NCT01730157</i>	<i>Terminated</i>
	Ipilimumab + nivolumab + radioembolization	0	NCT02913417	Recruiting
TILs	Tumor infiltrating lymphocytes	II	NCT01814046	Accrual complete
	Cellular adoptive immunotherapy + ipilimumab	I	NCT03068624	Recruiting
T cell redirection	IMCgp100 (second-line)	I	NCT02570308	Recruiting
	IMCgp100 (first-line)	II	NCT03070392	Recruiting
Antibody–drug conjugate	Glembatumumab vedotin	II	NCT02363283	Accrual complete
Epigenetic therapy				
HDAC inhibition	Vorinostat	II	NCT01587352	Accrual on hold
	Pembrolizumab + entinostat (PEMDAC)	II	NCT02697630	Recruiting
BET inhibition	PLX51107	I	NCT02683395	Recruiting
Liver-directed therapy				
IHP	IHP <i>versus</i> best alternative care (SCANDIUM)	III	NCT01785316	Recruiting
PHP	PHP <i>versus</i> TACE, dacarbazine, ipilimumab, or pembrolizumab (FOCUS)	III	NCT02678572	Recruiting
*Study terminated for scientific or other reasons. BET, bromodomain and extra-terminal; HDAC, histone deacetylase; IHP, isolated hepatic perfusion; PHP, percutaneous hepatic perfusion; TIL, tumor infiltrating lymphocyte.				

Tableau II.3 : Traitements actuellement en essais clinique contre les métastases du mélanome uvéal.
Tableau d'après (Yang et al., 2018).

Chapitre III : La phosphatase PRL-3 et cancers

Notre laboratoire a mis en évidence la surexpression du gène PTP4A3 codant pour la phosphatase PRL-3 dans les tumeurs qui métastasent. En effet, une analyse transcriptomique a été réalisée sur 28 tumeurs primaires issues de patients ayant développé des métastases dans les trois ans suivant l'énucléation (méta1 - classe 2) et sur 29 tumeurs issues de patients n'ayant pas développé de métastases dans le même intervalle de temps (méta0 –classe 1). Sur les 983 gènes identifiés comme différentiellement exprimés entre les deux catégories de tumeurs, le gène PTP4A3/PRL-3 localisé dans la région 8q21 correspondait au gène le plus significativement différentiel exprimé entre ces deux groupes de tumeurs ($p < 10^{-5}$). De plus, sa surexpression est fortement prédictive de la survie des patients et du développement métastatique [170]. Ce chapitre présente les membres de la famille des PRLs ainsi que leur rôle, et plus particulièrement celui de PRL-3, dans les cancers.

1. La famille des PRLs

Les PRLs appartiennent à la famille des phosphatases à double spécificité (DPS) qui est un sous-groupe de la famille des PTPs (Protéines tyrosines phosphatases) de classe I. Les PDSs reconnaissent, en plus des phosphotyrosines, les phosphosérines, phosphothréonines, les phospholipides, les ARN et le glycogène [250], [251]. Les PTPs jouent un rôle crucial dans la régulation des voies de signalisation impliquées dans le contrôle de la différenciation cellulaire, la prolifération, l'adhérence, la migration, la survie ou encore l'apoptose [250]. La dérégulation de l'activité des PTPs a été identifiée et impliquée dans la progression de diverses pathologies incluant entre autres le cancer [252]. C'est notamment le cas des PRLs qui, bien que leur rôle physiologique soit encore très peu connu, ont été montrés comme jouant un rôle dans la prolifération cellulaire, la migration, l'invasion la croissance tumorale, les métastases et ont été proposés comme bio-marqueurs potentiels dans la progression tumorale [253].

Caractéristiques des PRLs

La famille des PRLs est composée de trois membres homologues, PRL-1, PRL-2 et PRL-3 codés respectivement par les gènes PTP4A1 (6q12), PTP4A2 (1p35) et PTP4A3 (8q24). Il y a 87% d'identité de séquence entre PRL-1 et PRL-2; 79% entre PRL-1 et PRL-3 et 76 % entre PRL-2 et PRL-3 [253]. Les PRLs sont de petites protéines d'environ 22kda, de 173 acides aminés pour PRL-1 et PRL-3 et de 167 pour PRL-2 [254]–[256]. La séquence en acides aminés des PRLs est présentée **Figure III.1A**.

Les PRLs contiennent dans leur partie N-terminale le motif conservé CX5R caractéristique du site catalytique des PTPs (C : cystéine, X : acide aminé, R : arginine) dont la cystéine est le résidu catalytiquement actif du domaine (Cystéine 104 dans PRL-1 et PRL-3 et cystéine 101 pour PRL-2). La partie C-terminale des PRLs contient une région polybasique immédiatement suivie par un motif CAAX (où C est une cystéine, A un acide aminé aliphatique et X un acide aminé) (**Figure III.1B**). La prénylation post-traductionnelle du motif CAAX est importante pour l'ancrage des PRLs à la membrane plasmique et leur localisation intracellulaire [256]–[258]. Aucun autre membre des PTPs ne possède le motif CAAX, les PRLs sont donc les seuls membres des PTPs à être prénylés. Cependant, une région polybasique suivie du motif CAAX est retrouvée chez de nombreux membres des GTPases de la famille Ras de même que le

motif CAAX est commun chez les phosphatidylinositol-5-phosphatases [259]. La région polybasique contribuerait à l'ancrage membranaire en interagissant avec les phospholipides chargés négativement [260]–[262] et pourrait avoir un rôle intéressant dans la localisation nucléaire des PRLs [258], [261] bien qu'il ne s'agisse probablement pas d'un signal de localisation nucléaire [263].

A

PRL-1	MARMNRPAPVEV	TYKNMRFLI	THNPTNATLNKFI	EELKKYGVTT	IVRVCEATYD	TTLVEK	60	
PRL-2	MNRPA	VEISYENMRFLI	THNPTNATLNKFI	EELKKYGVTT	LVRVCDATYD	KAPVEK	57	
PRL-3	MARMNRPAPVEV	SYKHMRF	LI THNPTNATL	STFIEDL	KKYGATTV	VRVCEV	TYDKT	60
					C(X) ₅ R			
PRL-1	EGIHVLDWPFDDGAPP	SNQIVDDWLSLVK	IKFREEPGCC	IAVHCVAGLGR	APVLVALALI		120	
PRL-2	EGIHVLDWPFDDGAPP	PNQIVDDWLNLLK	TKFREEPGCCVAVH	CVAGLGR	APVLVALALI		117	
PRL-3	DGITVVDWPFDDGAPP	PGKVVEDWLSLVK	AKFCEAPGSCVAVH	CVAGLGR	APVLVALALI		120	
					CAAX			
PRL-1	EGGMKYEDAVQFI	RQRRGAFNSKQLLYL	EKYRPKMRLRF	KDSNGHRNN	CCIQ		173	
PRL-2	ECGMKYEDAVQFI	RQRRGAFNSKQLLYL	EKYRPKMRLRF	RDINGH	CCVQ		167	
PRL-3	ESGMKYEDA	IQFIRQRRGA	INSKQLTYLEKYR	PKQRLRFKD	PHTHKTR	CCVM	173	

B

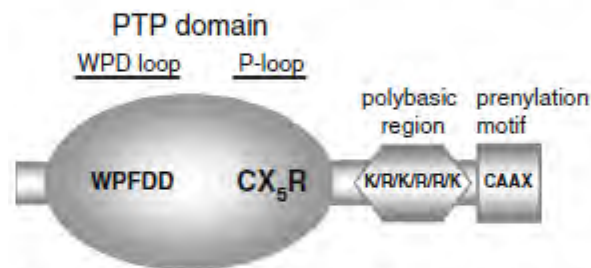


Figure III.1 : Caractéristiques des PRLs.

A Alignement de la séquence protéique des PRLs (avec clustal W). Les acides aminés communs aux trois PRLs sont surlignés. Le motif CX₅R et le motif de prénylation CAAX sont encadrés. Figure et légende d'après (Stephens et al., 2005).

B Représentation schématique des PRLs. PRL-1 PRL-2 et PRL-3 partagent des domaines structuraux homologues. Le domaine catalytique ou domaine PTP est responsable de l'activité enzymatique et requiert le site actif CX₅R (boucle-P) ainsi que les résidus de la boucle WPD (aspartate (D), donneur de proton) pour le transfert du phosphate. La région polybasique et le motif de prénylation CAAX sont importants pour la détermination de la localisation intracellulaire des protéines PRLs. C : cystéine ; A : résidu aliphatique et X : tout acide aminé. Figure et légende d'après (Bessette et al., 2007).

Structure des PRLs

La structure cristallographique des trois PRLs a montré qu'elles possèdent des structures similaires avec une plus grande similitude entre PRL-1 et PRL-3 [260], [262], [264]–[266].

Les PRLs forment une boucle WPD (WPD loop) ainsi qu'une boucle P (P loop) (motif CX₅R) au niveau de la poche catalytique hydrophobe peu profonde du site actif, commun aux PDSs, qui sont essentielles au mécanisme de catalyse utilisé par cette super-famille d'enzymes [267]. Que les substrats soient dotés de chaînes latérales courtes dans le cas de phosphosérine et phosphothréonine ou de chaînes latérales

longues pour les phosphotyrosines, les résidus présentés pourront être déphosphorylés par la cystéine active localisée à la base de la poche [260], [262], [264], [265]. L'étude de leur topologie a montré que les PRLs sont très semblables aux phosphatases à double spécificité telles que : PTEN, VHR/DUSP3 (Dual specificity protein phosphatase 3), CDC14 et KAP (Kinase-Associated Phosphatase) [262], [265]. Néanmoins, l'alignement de séquences des PRLs avec CDC14, KAP, PTEN et VHR montre que, bien qu'il y ait de fortes similitudes, des différences importantes sont observées dans certaines régions du site actif. Ces différences rendent le site catalytique plus ouvert et superficiel ce qui contribue à la spécificité des PRLs vis à vis de leurs substrats et leurs partenaires d'interaction [268] et peut expliquer la capacité des PRLs à s'accommoder à un large choix de substrats.

Ces études ont également montré que PRL-1 cristallise sous forme d'un trimère et est capable de former des dimères ou des oligomères *in vivo* [265], [268]. Cette trimérisation semble essentielle aux fonctions pro-migratoires et pro-prolifératives de PRL-1 dans des cellules HEK293. Cette oligomérisation de PRL-1 implique des résidus identiques ou conservés entre les différents membres des PRLs. Il a d'ailleurs été montré qu'une forme recombinante de PRL-3 est également capable de former des dimères et des trimères *in vivo* [261]. De plus, un pont disulfure peut se former de façon réversible entre la cystéine conservée 49 (pour PRL-1 et PRL-3) ou cystéine 46 (pour PRL-2) et la cystéine 104 du site catalytique et serait capable d'inhiber l'activité catalytique des PRLs ce qui suggère que les PRLs pourraient être inactivées par oxydation [262], [265].

Fonctions physiologiques des PRLs

Le ou les rôle(s) physiologique(s) des PRLs sont actuellement mal connus. Une étude suggère que PRL-1 serait impliqué dans la réponse au stress oxydant des cônes de la rétine chez les mammifères [269]. PRL-2 serait quant à lui impliqué dans la spermatogénèse [270], le développement du placenta [271] et dans la prolifération des cellules souches hématopoïétiques [272]. Ces résultats suggèrent que PRL-2 aurait un rôle dans la prolifération cellulaire via la régulation de la voie PTEN/PI3K/AKT. Enfin, pour PRL-3, notre laboratoire a montré que la protéine est requise pour la migration des cellules CCNCs pendant le développement embryonnaire chez *Xenopus laevis* [273]. Il est important de noter qu'une étude suggère que les PRLs auraient des fonctions physiologiques redondantes puisque PTP4A3 n'est pas un gène essentiel chez la souris [274].

Expressions normales et pathologiques des PRLs

Localisation subcellulaire des PRLs

Les PRLs sont retrouvés à la membrane plasmique, à la surface des endosomes précoces mais également dans les autophagosomes et une faible quantité de protéines non farnésylées est retrouvée dans le noyau et soluble dans le cytoplasme dans certains types cellulaires [255], [257], [275], [276]. Cette localisation est due à la prénylation du motif CAAX dans leur partie C-terminale. La prénylation correspond à une modification post-traductionnelle qui consiste à l'ajout d'un groupement isoprénoïde (farnésyl ou géranyl-géranyl) sur une acide aminée cystéine en position carboxyterminale ou proche de cette extrémité. Cette modification permet l'ancrage des protéines prénylées aux membranes. Il a été montré que l'inhibition de la farnésyltransférase par un inhibiteur pharmacologique (FTI) ou bien la

mutation ou la délétion du motif CAAX, induit une relocalisation des PRLs dans le noyau et le cytoplasme des cellules [257], [258].

La farnésylation des PRLs est donc nécessaire à leur localisation membranaire. De plus, des études montrent que la relocalisation des PRLs dans le noyau ou le cytoplasme, en absence de farnésylation, inhibe les fonctions des PRLs, notamment leurs effets pro-migratoires et pro-métastatiques. En effet, l'expression d'un mutant de PRL-1 non prénylable induit des défauts de mitose lorsqu'il est exprimé dans des cellules HeLa ainsi que des défauts de croissance et de migration lorsqu'il est exprimé dans des HEK293 [261]. L'expression de forme non prénylable de PRL-1 et PRL-3 dans des cellules de carcinome de côlon SW480 inhibe les capacités migratoire et invasive de ces cellules [277]. Il a également été montré que l'absence de farnésylation de PRL-3 dans une lignée cellulaire de mélanome cutané B16F1 diminuait leur capacité migratoire *in vitro* et invasive *in vivo* dans des modèles murins xénotransplantés [278]. Enfin, une étude réalisée dans notre laboratoire a montré que l'inhibition de la farnésylation de PRL-3 dans les cellules de mélanome uvéal abolit la migration accrue induite par PRL-3 [279].

La région polybasique adjacente au motif CAAX semble également favoriser la localisation des PRLs à la membrane plasmique. En effet, la substitution partielle ou totale des six résidus basiques en alanine abolit l'association de PRL-1 à la membrane [268] ainsi que la prolifération et la migration des cellules HEK293 surexprimant PRL-1 [261]. Cela serait dû la formation d'interactions électrostatiques entre les résidus basiques chargés positivement et les membranes lipidiques chargées négativement [261].

La localisation subcellulaire diffère entre les PRLs mais aussi d'un type cellulaire à un autre et semble être lié au cycle cellulaire. En effet, il a été montré que, suite à une hépatectomie, PRL-1 est surexprimé et se localise dans le noyau. De plus, la localisation de PRL-1 dans les cellules HeLa n'est pas dépendante de la farnésylation mais du cycle cellulaire. PRL-1 est associé à la membrane du réticulum endoplasmique à l'interphase et est localisé dans les centrosomes et le fuseau mitotique dans les cellules mitotiques, suggérant un rôle de PRL-1 dans la prolifération à travers la régulation de la mitose [258]. PRL-1 est également localisé dans le noyau des cellules de plusieurs types de tissus épithéliaux incluant les cellules intestinales différenciées [280], [281], et les cellules zymogènes gastriques [96]. Cependant dans les autres tissus, tels que la rétine, PRL-1 n'est pas nucléaire [282]. Concernant PRL-3, une étude a montré que la protéine fait des allers-retours entre le noyau et le cytoplasme durant la transition S/G2M et G0/G1 des cellules de myélome [276]. D'autres études ont mis en évidence un rôle de PRL-3 dans des processus nucléaires. Tout d'abord, un rôle de PRL-3 dans la déprotection des télomères au travers de son interaction avec le complexe RAP1/TRF2 (Human Repressor activator protein 1/ Telomeric repeat-binding factor 2) a été décrit [283]. Une étude a également mis en évidence un rôle épigénétique de PRL-3 dans la régulation de la méthylation des histones en affectant l'activité des histones déméthylases JMJD1B et JMJD2B (Jumonji domain-containing protein 1B et 2B) dans le cancer colorectal [284]. Enfin, une étude suggère que PRL-3 pourrait déphosphoryler la protéine NHERF1 dans le noyau pour permettre la translocation de celle-ci dans le cytoplasme [285].

Ces différences de localisation semblent donc dépendre d'une régulation effective de leur prénylation et suggèrent des différences de partenaires et/ou de cibles ainsi que des mécanismes d'actions différents.

Expressions des PRLs dans les tissus sains

L'ARNm des PRLs a été identifié dans le muscle squelettique dans des modèles murins, néanmoins les PRLs sont également exprimés dans d'autres tissus différents en fonctions de chaque membre.

Chez le rat, PRL-1 est exprimé dans le cerveau, le muscle squelettique et dans différents tissus épithéliaux du système digestif [275], [286], [287]. PRL-2 est exprimé dans l'hypophyse, le cortex cérébral, les glandes surrénales, les testicules, ainsi que dans les reins et le cœur [287], [288] (<http://www.proteinatlas.org/>). Enfin, PRL-3 est exprimé dans le cœur du foetus.

Chez la souris, PRL-1 et PRL-2 sont exprimés de façon ubiquitaire avec une expression de PRL-2 prédominante dans le muscle squelettique. PRL-3 est majoritairement exprimé dans le cœur et le muscle squelettique adulte [287]. PRL-3 est aussi exprimé dans les cellules épithéliales des villosités intestinales. La protéine a été détectée par western blot dans des lysats de cœur foetal et de rate adulte, et en moindre mesure dans le cœur adulte, le muscle squelettique, le pancréas, les poumons le cerveau et l'intestin foetal [289].

Dans des tissus humains adultes, PRL-1 et PRL-2 semblent, comme chez la souris, être exprimés plus largement que PRL-3. PRL-2 est détecté de façon ubiquitaire. PRL-1 est aussi exprimé dans la plupart des tissus à des niveaux moins élevés que PRL-2 [290] ce qui suggère que PRL-1 et PRL-2 sont impliqués dans des processus élémentaires communs à différents tissus. En revanche, le profil d'expression PRL-3 diffère, il est principalement exprimé dans le muscle squelettique et le cœur. Il est également faiblement détecté dans 35 autres tissus humains tels que la rétine, le foie et le pancréas [291] (site : www.genecards.org). La protéine est exprimée de façon prédominante dans le cœur, la rétine et les monocytes. (www.genecards.org).

Les profils d'expression des PRLs ont également été caractérisés durant le développement embryonnaire. Chez le poisson-zèbre, PRL-1 et PRL-2 ont un profil d'expression similaire, prépondérant dans le lignage neuronal (système nerveux central). A l'inverse PRL-3 présente un profil plus spécifique aux muscles. Un seul membre PRL a été identifié chez les invertébrés *Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans* et *Amphioxus Branchiostoma floridae*. Durant l'embryogénèse le PRL de la drosophile est exprimé dans le système nerveux central et l'intestin ; et celui de l'amphioxus est exprimé ubiquitairement pendant l'embryogénèse précoce, puis se spécialise au tube neural antérieur. L'analyse phylogénétique suggère que les trois membres PRLs présents chez les vertébrés seraient le produit d'évènements de duplications qui auraient eu lieu à la base du lignage des vertébrés [292].

L'ensemble de ces observations indique que les membres des PRLs seraient conservés entre les différentes espèces des vertébrés et auraient, dès le développement embryonnaire, un important rôle dans les processus élémentaires de différents tissus. A l'âge adulte il y aurait une spécification de l'expression de PRL-3 de manière tissu-spécifique chez les mammifères.

Expressions des PRLs dans les cancers

Depuis que PRL-3 a été identifié comme étant surexprimé dans les métastases hépatiques originaires de cancer du côlon mais pas dans le tissu sain du colon ni dans la tumeur primaire, l'implication des membres des PRLs dans la tumorigénèse et le développement métastatique a été bien étudiée. Il est

maintenant bien établi que les PRLs, et plus particulièrement PRL-3, font partie des quelques phosphatases impliquées dans le développement du cancer [293]–[296].

PRL-1 est fortement exprimé dans les métastases ganglionnaires lymphatiques des adénocarcinomes [297]. PRL-1 est également exprimé dans des carcinomes rénaux, des mélanomes cutanés, et dans des lymphomes ovariens. De plus, il a été montré que la surexpression de PRL-1 dans des cellules cancéreuses du pancréas et des poumons augmente leurs propriétés migratoires et invasives [258], [298], [299]. Les voies de signalisation dans lesquelles PRL-1 intervient sont étudiées et révèlent la régulation de molécules impliquées dans la prolifération (inhibition de p21, activation d'Akt), la migration et l'invasion cellulaire (activation de ERK, Src et Rho GTPase) [253], [293].

PRL-2 est le membre le moins étudié des PRLs. PRL-2 est surexprimé dans des lignées cellulaires et/ou tumeurs primaires du cancer du poumon, du cancer du sein, et du pancréas [295], [296], [298], [300]. PRL-2 est également exprimé à des niveaux importants dans les carcinomes de la prostate. La double extinction de PRL -1 et PRL-2 induit une diminution de la migration et de la formation de colonies en agar mou des lignées cellulaires cancéreuses pancréatiques PANC1 et MIA PaCa-2 [298]. Son expression est également associée à la formation et à la progression tumorale de différents cancers, incluant le cancer de la prostate et du sein [296].

PRL-3 est quant à lui le membre des PRLs le plus étudié car il est le plus fréquemment surexprimé dans les cancers. Une étude a montré que des souris déficientes en PRL-3 développent deux fois moins de tumeurs du colon induites par des agents carcinogènes (azoxyméthane (AOM)) et Dextran Sodium Sulfate (DSS)) comparées aux souris contrôle [274]. Ces résultats montrent d'une part que PTP4A3 n'est pas un gène essentiel, ce qui pourrait s'expliquer par la redondance des fonctions physiologiques des différents PRLs. Et d'autre part, cela appuie l'hypothèse que PRL-3 est un gène médiateur de la progression tumorale. Les détails sur son expression dans les cancers, son implication dans la tumorigenèse et le processus métastatique, sa régulation et son inhibition se trouvent dans la partie suivante.

2. PRL-3 dans les cancers

Expression de PRL-3 dans les cancers

Cancer colorectal

L'investigation de l'expression de PRL-3 dans les cancers a débuté en 2001 lorsque la protéine a été montrée comme étant la seule présente dans 100% des métastases du cancer colorectal [301]. Une autre étude a montré que l'amplification, du gène PTP4A3 était le mécanisme de surexpression de la protéine [302]. Il a également été montré que bien que PRL-3 soit absent de l'épithélium normal et du carcinome primaire colorectal non métastatique, la protéine est retrouvée dans les métastases du foie, des poumons, du cerveau, des ovaires et des ganglions lymphatiques [303], [297], [304]–[306]. L'analyse statistique de l'expression de la protéine PRL-3 montre une corrélation positive avec la taille de la tumeur, le grade de la malignité ainsi que d'autres facteurs. La surexpression de PRL-3 est également associée à un mauvais pronostic de survie des patients après 5 ans. L'ensemble de ces données montre

l'implication de PRL-3 dans les métastases du cancer colorectal et apparaît comme un excellent marqueur pronostic.

Cancer gastrique

Contrairement au cancer colorectal, une forte expression de PRL-3 est retrouvée dans les tumeurs primaires du cancer gastrique et dans les métastases des ganglions lymphatiques [307] ou du péritoine [308]. Il y a une corrélation positive entre la surexpression de PRL-3 dans les tumeurs primaires et la taille de la tumeur, le stade, l'invasion et les métastases. PRL-3 est donc, de même que pour le cancer colorectal, un facteur de mauvais pronostic dans le cancer gastrique. L'ensemble de ces études montre donc que PRL-3 a un rôle crucial dans la propagation du cancer gastrique pour former des métastases et que la phosphatase est donc un bon marqueur pronostic chez les patients et peut être utilisée comme cible thérapeutique.

Cancer du sein

PRL-3 est exprimé dans les tumeurs primaires et les métastases du cancer du sein mais également dans les adénomes et le tissu sain. Néanmoins, l'expression de PRL-3 dans la tumeur primaire est plus élevée que dans les adénomes et le tissu sain mais plus faible que dans les métastases dans les ganglions lymphatiques. De même l'expression de PRL-3 est plus élevée dans les tumeurs primaires métastatiques que dans les non métastatiques [309], [310]. Ces études montrent donc l'implication de PRL-3 dans le cancer du sein et les métastases

Cancer des ovaires

Il y a également une corrélation entre l'expression de PRL-3 et la progression du cancer des ovaires, en effet son expression est plus élevée dans les tumeurs de stade avancé (stade III) par rapport à celles de stade plus précoce (stade I) [311]. Bien qu'il n'y ait pas de corrélation entre l'expression de PRL-3 et les paramètres clinico-pathologiques, il a été montré que les patients ayant une surexpression de PRL-3 ont 69,5% de risques en plus de décès comparés aux patients sans surexpression de la phosphatase [312]. Ces études confirment donc l'implication de PRL-3 dans le cancer des ovaires.

Les autres cancers

La surexpression de PRL-3 a également été mise en évidence dans d'autres cancers : le cancer de l'œsophage [313], [314], le cancer du col de l'utérus [315], le carcinome rhino-pharyngien [316], le Cholangiocarcinome intra-hépatique [317], le cancer du foie [318], le cancer des poumons [319], les gliomes [320], le carcinome adénoïde kystique des glandes salivaires [321], le mélanome uvéal [322], les leucémies myéloïdes [323] et les myélomes multiples [324].

Ces observations permettent donc d'identifier la surexpression de PRL-3 comme un acteur central de la progression tumorale et du développement métastatique dans de nombreux cancers. La compréhension de son mécanisme et l'identification de ses cibles apparaissent donc comme un enjeu majeur.

Voies de signalisation médiées par PRL-3

Ces dernières années, de nombreuses études ont été menées afin d'identifier de nouvelles cibles de PRL-3 mais également de mieux comprendre les mécanismes et voies de signalisation régulés par la phosphatase. Ces études ont permis de mettre en évidence un rôle de PRL-3 comme acteur central de

toutes les étapes clés de la tumorigenèse et du développement métastatique. En effet, PRL-3 est impliqué dans : le cycle cellulaire, la survie et la prolifération, l'angiogenèse, l'adhésion, le remodelage de cytosquelette, la TEM et la motilité et enfin l'invasion. Parmi les voies de signalisation régulées par PRL-3 se trouvent les voies PI3K/Akt [325], mTOR [326], [327], MAPK [328], VEGF [329], [330], p53 [331]–[333], Src [334], STAT3 [335] et la voie des RhoGTPases [277], [336], [337]. Certaines cibles directes de PRL-3 ont également été identifiées, comme : l'ezrin [338], JAM2 [339], les intégrines α 1 et β 1 [340], [341], la stathmine [342], la kératine 8 [343], Arf1 [344], RAP1 [345] et PI(4,5)P2 [346] (**Figure III.2**). Au cours de ma thèse, la synthèse de ces études a été formalisée sous la forme d'une carte dans le cadre du projet NaviCell réalisé en collaboration avec Inna Kuperstein. Ce travail a donné lieu à la rédaction d'une revue qui résume l'ensemble des données de la carte et qui montre l'analyse réalisée à l'aide du logiciel Cytoscape 2.7.0 (plugin BiNoM 2.5). Les résultats se trouvent dans la section résultats partie II.

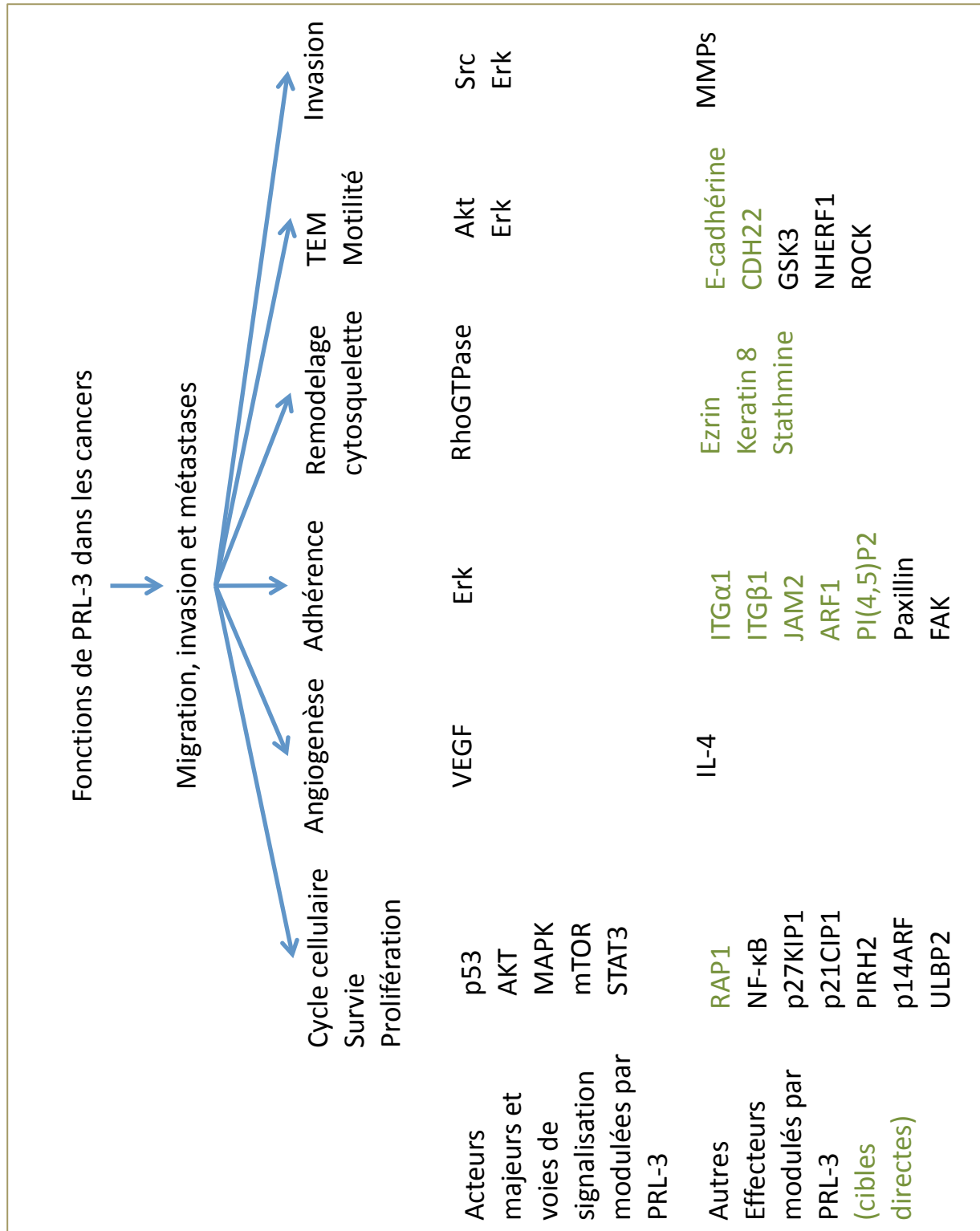


Figure III.2 : Les acteurs et voies de signalisation majeurs régulés par PRL-3 dans les différents processus clés du développement tumoral et métastatique.

ITG : intégrine

Régulation de PRL-3

PRL-3 est donc un élément clé impliqué dans la progression tumorale et les métastases, il est donc important de comprendre par quels mécanismes l'expression de cette protéine est régulée. Plusieurs études ont montré qu'il y avait une amplification de la région chromosomique 8q24.3 contenant le gène PTP4A3, notamment dans le cancer du côlon et les métastases [301], le cancer du sein [347], le cancer gastrique [314] et le mélanome uvéal [322]. L'amplification chromosomique est un mécanisme qui augmente l'expression des gènes de la région amplifiée et donc potentiellement de certains oncogènes et peut ainsi expliquer la surexpression de PRL-3 dans certains types de cancers [301], néanmoins des études montrent que ce mécanisme n'est pas toujours explicatif de la surexpression de PRL-3. En effet, le séquençage d'exon provenant de 10 patients atteints d'AML (leucémie aiguë myéloblastique) ayant des taux élevés de PRL-3 a montré qu'il n'y avait pas d'amplification du gène PTP4A3 ou de mutations somatiques [348]. De même, une étude réalisée dans le laboratoire a montré que la surexpression de PRL-3 dans le mélanome uvéal ne semble pas être une simple conséquence de l'amplification du gène PRL-3 [322], ce qui suggère donc qu'il existe des régulations transcriptionnelles, traductionnelles ou post-traductionnelles conduisant à une expression aberrante de PRL-3 [349].

Régulation transcriptionnelle

Le suppresseur de tumeur p53 a été le premier régulateur transcriptionnel décrit de PRL-3. En effet, p53 induit l'expression du gène PTP4A3 [331], [350]. Snail est également capable d'activer la transcription de PRL-3 en se fixant sur son promoteur dans le cancer du côlon [351]. Le VEGF induit l'expression de PRL-3 en augmentant l'expression du facteur de transcription MEF2C qui interagit également avec le promoteur de PRL-3 [352]. Plus récemment, il a été montré que STAT3 (signal transducer activator of transcription 3) régulait positivement la transcription de PRL-3 dans les cellules de leucémie [348].

Le TGF β , quant à lui, a été identifié comme inhibiteur transcriptionnel en médiant l'interaction des facteurs de transcription Smad2 et Smad3 sur le promoteur de PTP4A3 dans les cellules cancéreuses. Le TGF β agirait donc comme suppresseur de tumeur et sa perte conduirait à la surexpression de PRL-3 et donc à la progression tumorale [353].

En plus des facteurs de transcription, l'implication des microARNs dans la régulation transcriptionnelle de PRL-3 a également été décrite. En effet, il a été montré que miR-495, miR-551a dans le cancer gastrique et miR-137 dans le glioblastome régulent négativement la transcription de PRL-3 et ainsi inhibaient la migration et l'invasion [354]–[356].

Régulation traductionnelle

Des études réalisées dans le cancer du côlon, du sein, du poumon et autres ont montré que la quantité de protéine PRL-3 ne concordait pas toujours avec la quantité d'ARNm ce qui suggère une régulation traductionnelle de PRL-3. En effet, une étude a identifié PCBP1 (poly (C)-binding protein 1) comme étant capable d'interagir avec le 5'-UTR de l'ARNm de PRL-3 et d'inhiber sa traduction. Néanmoins PCBP1 n'inhibe pas complètement la traduction de PRL-3 ce qui suggère qu'il existe d'autres répresseurs traductionnels de PRL-3 encore non identifiés [357].

Modifications post-traductionnelles

De nombreuses études ont été faites ces dernières années sur les modifications post-traductionnelles de PRL-3 démontrant ainsi la complexité de sa régulation. Les modifications post-traductionnelles peuvent moduler la stabilité de la protéine mais également sa localisation subcellulaire, son activité ou bien ses interactions avec ses partenaires.

Comme décrit précédemment, PRL-3 est capable de former un pont disulfure réversible entre la cystéine catalytique C104 et la cystéine proximal C49 lorsque la protéine est oxydée. Dans les cellules, les protéines oxydées sont réduites par la thioredoxine (TRX) ou des protéines associées en utilisant un donneur d'électrons par la TRX réductase (TrxR) qui utilise l'électron apporté par le NADH. Dans ce contexte, TRP32 (protéine associée à la TRX) réduit les PRLs les protégeant ainsi de l'oxydation, maintenant ainsi leur activité et par conséquent contribue à la progression tumorale et métastatique [269], [358], [359].

Phosphorylation

Pour le moment seul deux résidus de PRL-3 ont été décrits comme pouvant être phosphorylés. Une étude a montré que Src était capable de phosphoryler PRL-3 sur le résidu Y53 et la phosphorylation de ce résidu par Src est essentielle à l'invasion et à la motilité induite par PRL-3 dans le cancer du colon [262], [360]. Une autre étude a montré que le résidu Y216 de PRL-3 était phosphorylé cependant, la kinase impliquée et le rôle la phosphorylation de ce résidu restent encore inconnus [361].

Le mécanisme biochimique et les conséquences structurelles de la phosphorylation de PRL-3 doivent encore être investigués. Les auteurs émettent l'hypothèse que la phosphorylation du résidu Y53 pourrait changer l'affinité de PRL-3 pour un site spécifique de la membrane plasmique, ou bien pourrait modifier son activité catalytique ou encore pourrait stimuler l'interaction avec d'autres protéines cibles. De plus le résidu Y53, étant près du site actif de PRL-3, a été précédemment suggéré comme participant à la fixation du substrat [262].

La prédiction de la phosphorylation d'autres résidus de PRL-3 a été faite chez la souris via le logiciel ScanProsite [287]. Les sites S13 et T165 ont été prédits pour être phosphorylés par la PKC (protéine kinase C) et quatre sites (T32, T56, T64 et T147) ont été prédits pour être phosphorylés par la caséine kinase II. Enfin, Y14 a également été prédit comme résidu phosphorylé de PRL-3.

La phosphorylation de PRL-3 semble donc être importante pour sa régulation. Cependant, des études doivent être menées pour valider les prédictions et déterminer le rôle de chaque phosphorylation dans la régulation de PRL-3.

Ajout de groupements hydrophobes

Comme décrit précédemment, le motif CAAX de PRL-3 permet sa prénylation, c'est-à-dire l'ajout d'un groupement isoprénoïde sur la cystéine, puis il y a protéolyse du peptide AAX suivi de la carboxyméthylation de l'extrémité C-terminale [362].

Il existe deux types de prénylation : la farnésylation via l'enzyme farnésyltransférase (FT) et la géranylgeranylation catalysée par les géranylgeranyl transférases (GGT I or GGT II). PRL-1 et PRL-2

peuvent être farnésylés et géranylgeranylés [257] en revanche, bien que PRL-3 puisse être farnésylé les données sur sa géranylgeranylation sont contradictoires [257], [361]. En plus d'influer sur sa localisation subcellulaire, la farnésylation du motif CAAX de PRL-3 contribuerait à son oligomérisation médiée par des forces hydrophobiques [263]. Cette oligomérisation limiterait l'accès au substrat et par conséquent diminuerait l'activité de PRL-3. Là encore, les études doivent être approfondies pour comprendre le rôle de l'oligomérisation dans l'activité de PRL-3.

Il a également été proposé que PRL-3 puisse être palmitoylé sur la seconde cystéine du motif CAAX (CCVM) ce qui empêcherait les étapes de protéolyse et de carboxyméthylation, comme c'est le cas pour la protéine cdc42 (cell division control 42) qui possède également un motif CAAX [363]. Contrairement à la prénylation, cette modification est réversible et contrôle la localisation subcellulaire, le trafic intracellulaire et les interactions protéine-protéine [364].

Ubiquitination

La protéine FKBP38 a été identifiée comme provoquant la dégradation de PRL-3 par le protéasome [365]. D'autres études ont montré que PRL-3 participerait à une boucle de contrôle, dans laquelle son accumulation activerait l'autophagie et par conséquent PRL-3 serait dégradé [366]. Ces données suggèrent une régulation complexe du niveau de protéine PRL-3 par différents mécanismes de dégradation, néanmoins, aucune de ces études ne suggère de modifications post-traductionnelles impliquées dans le ciblage de la protéine pour la dégradation par le protéasome ou l'autophagie ni n'explique le stimulus qui aboutit à la dégradation. L'utilisation du logiciel de prédiction des sites d'ubiquitination (<http://bdmpub.biocuckoo.org/>) a permis de prédire quatre lysines potentielles. Une étude a montré que la protéase USP4, qui clive l'ubiquitine de nombreux substrats, interagit avec PRL-3 et diminue le niveau de son ubiquitination, prévenant ainsi sa dégradation dans les cellules cancéreuses [367]. De plus, un peptide consensus de SUMOylation aux alentours de la lysine 125 et un site d'interaction de SUMO sur la séquence de PRL-3 ont été prédits (<http://sumosp.biocuckoo.org/showResult.php>). Des études doivent être menées afin de comprendre le mécanisme moléculaire de l'ubiquitination et la SUMOylation de PRL-3, de déterminer quels résidus sont impliqués et le rôle de ces modifications dans l'activité de la protéine.

Au vue de l'ensemble de ces données, la régulation de PRL-3 semble donc être complexe, faisant intervenir des mécanismes variés (régulation transcriptionnelle, traductionnelle, post-traductionnelle) (**Figure III.3**) néanmoins l'étude de l'ensemble de ces mécanismes doit encore être approfondie et beaucoup d'éléments sont encore à identifier. La compréhension de la régulation de PRL-3 est importante afin de mieux concevoir son rôle dans la progression tumorale, de pouvoir inhiber son mécanisme et influencer la progression métastatique et la survie des patients dans les cancers qui surexpriment PRL-3.

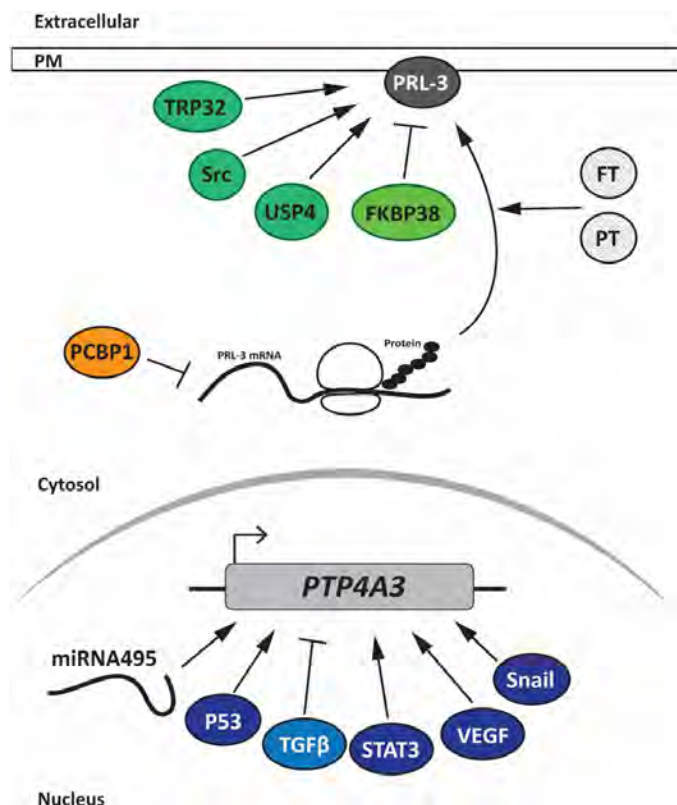


Figure III.3 : Régulation de l'accumulation de PRL-3.

Représentation de la régulation de l'expression, la localisation et de l'activité de PRL-3 au niveau transcriptionnel, traductionnel, et post-traductionnel.

Figure et légende d'après (Rubio et Köhn., 2016).

Inhibition de PRL-3

Comme décrit précédemment, l'expression de PRL-3 est impliquée dans le processus tumoral et métastatique dans une grande variété de cancers, ce qui fait de cette phosphatase une cible d'intérêt pour le développement de molécules à effets thérapeutiques capables d'inhiber spécifiquement l'activité et/ou la localisation de cette phosphatase afin de diminuer son potentiel métastatique. Néanmoins, ceci représente un défi, tout d'abord en raison de l'homologie de séquence de PRL-3 avec les deux autres membres des PRLs ainsi qu'avec la famille des PTPs, ensuite à cause des faibles données existantes sur sa structure tridimensionnelle et son rôle physiologique dans les tissus sains adultes où elle est majoritairement exprimée (cœur, muscle squelettique et rétine). Plusieurs inhibiteurs de PTP sont actuellement utilisés contre PRL-3 en recherche [314], [368], [369], néanmoins des efforts doivent être faits pour obtenir un composant sélectif utilisable dans le cadre de la médecine sur les patients.

Une étude a montré que la Thienopyridone (-amino-2-phenyl-5H-thieno [3,2-c] pyridine-4-one), dont les dérivés sont utilisés comme médicament antiagrégant plaquettaire, pouvait inhiber spécifiquement les PRLs ce qui provoque l'inhibition de la croissance cellulaire et induit le clivage de p130Cas et l'anoïkis [370]. Ces inhibiteurs constituent donc une cible attractive dans le traitement des cancers.

Une autre molécule identifiée comme inhibiteur de PRL-3 est la pentamidine (1,5-di(4-amidinophenoxy)pentane). Cette molécule est un antiparasitaire utilisé dans le traitement des leishmanioses ainsi que *Pneumocystis carinii* [371], cependant des études ont montré qu'elle était également efficace dans des modèles de différents cancers incluant les carcinomes à cellules rénales [372] et le mélanome cutané [373]. La pentamidine inhibe l'activité catalytique de formes recombinantes des PRLs *in vitro* et sur la croissance de lignées cellulaires cancéreuses humaines décrites pour exprimer PRL-1, PRL-2 et PRL-3 de manière endogène. De plus, la pentamidine provoque une réduction du volume tumoral d'un modèle murin de xénogreffe de mélanome [371]. La capacité de PRL-1, PRL-2 et PRL-3 à déphosphoryler un substrat peptidique *in vitro* est inhibée de manière dose-dépendante de la pentamidine, avec une inhibition optimale atteinte avec une concentration de 10ug/ml. Cette inhibition est irréversible dans le cas de PRL-3. En revanche, les données obtenues *in vivo* ne permettent pas de conclure sur un lien direct entre l'inhibition de PRL-3 ou d'un autre membre de la famille des PRLs et la réduction du volume tumoral [371]. De plus, la pentamidine n'est pas spécifique des PRLs puisqu'elle est également capable d'inhiber deux autres PTPs : PTP1B (Protein tyrosine phosphatase 1B) et **DUSP1** (Dual- specificity phosphatase- 1 aka MKP1) [371]. Enfin, en plus de son effet inhibiteur sur certaines phosphatases, la pentamidine a d'autres effets comme par exemple l'inhibition de la protéine de liaison au calcium, S100B qui interagit avec p53 [374], [375] et l'activité nucléase de MRE11, une enzyme impliquée dans la réparation des cassures double brin et bloque la réparation de l'ADN [376]. Ainsi, bien qu'elle semble avoir un large champ d'action, la pentamidine pourrait être proposée comme traitement aux patients atteints de cancers impliquant des taux élevés de PRL-3 [376].

Des composés dérivés de rhodanine sont également capables d'inhiber la phosphatase PRL-3 *in vitro*. De plus, des expériences de migration en chambre de Boyden révèlent que deux d'entre eux (CG-707 et BR-1) induisent une forte inhibition de la migration et l'invasion d'une lignée cellulaire de cancer colorectal DLD-1 surexprimant un PRL-3 recombinant. L'inhibition de PRL-3 par CG-707 et BR-1 est validée en western blot par l'augmentation du niveau de phosphorylation de l'ézrine et de la kératine 8 [377]. Ces mêmes résultats sont obtenus avec l'émodine, un dérivé de l'antraquinone [378]. Ainsi en raison de leur effet sur la migration et de leur faible cytotoxicité, ces deux composés pourraient être de bons candidats inhibiteurs de PRL-3 et permettent d'ouvrir les champs de possibilité pour la conception d'autres composés de synthèse ayant une action inhibitrice contre cette phosphatase. La spécificité de CG-707 et BR-1 envers PRL-1 et PRL-2 n'a pas été testée mais la forte homologie entre les membres de cette famille, suggère qu'elles pourraient également être inhibées [377], [379].

Quelques composés naturels ont également été décrits comme inhibiteur de PRL-3. C'est le cas du curcuma qui bloque spécifiquement l'accumulation de PRL-3 et par conséquent inhibe la phosphorylation de Src et STAT3 [380]. Une autre étude a montré que deux composés d'antraquinones contenus dans l'extrait de méthanol de racines de *Rubia akane* (*Rubiaceae*) inhibaient également l'activité de PRL-3 [368]. Ces composés inhibent la migration induite par PRL-3 dans les cellules à des doses de 5,2 et 1,3 mg/ml respectivement. Deux agents biflavonoïdes, le ginkgetine et le sciadopitysine, sont également capables d'inhiber 80% de l'activité catalytique de PRL-3 *in vitro*, à une concentration de 100ug/ml. Ces composés ont été extraits et isolés à partir de jeunes branches de la plante *Taxus cuspidata*, qui fait partie d'une famille de plantes médicinales, les taxacées, entre autres, connues pour

contenir la molécule active du paclitaxel (ou Taxol), qui est aujourd'hui utilisée comme agent anticancéreux dans le cadre du traitement des cancers de l'ovaire de stades avancés. Des études complémentaires doivent être effectuées afin de tester la spécificité de ces composés, leur activité *in vivo* envers PRL-3 et d'établir leur mode d'action (compétition ou non, réversible ou non) [381]. Enfin, une étude récente a identifié plusieurs procyanidines, qui sont des polyphénols naturels dérivés du thé vert et des herbes médicinales, comme inhibiteurs de l'activité des PRLs. Les procyanidines testés ont montré une forte sélectivité envers les PRLs *in vitro* comparée à d'autres phosphatases. Le traitement à la procyanidine C2 induit une diminution de la migration des cellules exprimant PRL-1 et PRL-3 [382].

La thérapie basée sur l'utilisation d'anticorps est également une méthode prometteuse pouvant être utilisée contre PRL-3. Cette technique a été utilisée dans un modèle animal dans lequel les chercheurs ont essayé de détruire les cellules cancéreuses exprimant PRL-1 et PRL-3 en utilisant les anticorps anti-PRLs appropriés [383]. Les anticorps monoclonaux anti PRL-1 et anti PRL-3 ont permis de bloquer la croissance tumorale et la formation de métastases dans les cellules qui exprimaient ces protéines. Les anticorps anti PRL-3 ne sont pas capable de bloquer PRL-1 et inversement. L'anticorps anti PRL-3 bloque les métastases des cellules du cancer des ovaires humains A2780, qui expriment de façon endogène PRL-3, mais n'a pas d'effet sur le développement tumoral dans les cellules de cancer du colon de souris CT26 qui n'expriment pas PRL-3. Plus récemment, l'anticorps PRL3-zumab a été testé dans le cancer gastrique. Les résultats ont montré que PRL3-zumab bloquait spécifiquement la croissance des tumeurs gastriques exprimant PRL-3. PRL3-zumab a montré un meilleur effet thérapeutique en monothérapie que lorsqu'il est combiné avec le 5-fluorouracil. PRL3-zumab prévient également la récurrence des tumeurs. D'un point de vue mécanistique, il a été montré que PRL-3 pouvait être externalisé et servir d'appât au PRL3-zumab qui va pouvoir recruter le système immunitaire dans le microenvironnement tumoral [384].

Enfin, une autre façon d'inhiber PRL-3 est d'empêcher sa localisation à la membrane plasmique. En effet, il a été montré que son activité pro-migratoire et pro-métastatique est dépendante de sa localisation à la membrane plasmique [257], [278]. Ainsi l'inhibition de sa farnésylation par des inhibiteurs de farnésyltransférases (FTI), permettrait de contrecarrer ses effets dans la progression cancéreuse. Néanmoins, ces inhibiteurs ont un large spectre d'action car ils ciblent également toutes les autres protéines portant un motif de prénylation CAAX, telles que les protéines oncogéniques Ras pour lesquelles ces FTI ont initialement été développés [385], [386], ils ne sont donc pas spécifiques à PRL-3. En revanche, ils ne se sont pas révélés efficaces en essais cliniques de phase II notamment par compensation par géranylgeranylation de Ras [387].

Chapitre IV : Les CRMPs

1. La famille des CRMPs

Les CRMPs pour « Collapsin Response mediator protein » correspondent à une famille de cinq phosphoprotéines cytosoliques (CRMP1 à CRMP5) de taille similaires (60 à 62 kDa) et ayant une forte homologie de séquence (50 à 70%). Ces protéines sont fortement exprimées dans le système nerveux au cours du développement embryonnaire et jouent un rôle important dans le guidage axonale, l'extension des neurites, l'effondrement du cône de croissance via leurs interactions avec les microtubules mais également dans le trafic vésiculaire via leurs interactions avec les moteurs moléculaires. Les CRMPs sont des MAPs (microtubule-associated proteins) qui possèdent de nombreux sites de phosphorylation dont certains sont conservés entre les différents membres. L'activité des CRMPs est modulée en fonction de leur état de phosphorylation. De même, chaque CRMP possède différentes isoformes ayant des fonctions différentes dans les cellules neuronales. Le rôle des CRMPs a surtout été étudié dans les neurones et il a été montré qu'une dérégulation de l'expression des CRMPs était impliquée dans nombreux troubles neurologiques. L'implication des CRMPs dans les cancers a également été étudiée.

Caractéristiques des CRMPs

CRMP2 est le premier membre des CRMPs à avoir été découvert dans deux études simultanées en 1995. Dans l'une de ces études, CRMP2 a été caractérisé comme un effecteur intracellulaire du signal d'effondrement du cône de croissance des axones induit par la molécule extracellulaire sémaphorine 3A (Sema3A) dans les ganglions de la racine dorsale du poussin [388]. CRMP2 a également été isolé et cloné au cours d'une étude portant sur les protéines fortement et spécifiquement synthétisées lors du développement du système nerveux chez le rat [389].

L'année suivante, CRMP1, CRMP2 et CRMP4 ont été découverts dans le système nerveux lors d'une étude sur des protéines homologues à la dihydropyrimidinase (DHPase, enzyme hépatique) [390]. En effet, Les CRMPs présentent une très forte homologie avec cette enzyme. Enfin, CRMP3 et CRMP5 ont été découverts en 2000 et 2001 respectivement dans le même laboratoire (Inserm U433) [391], [392]. Les deux protéines ont été isolées à partir du cerveau de rat et ont été identifiées comme des auto-antigènes.

CRMP2 a également été identifié chez *C. elegans* sous le nom de *Unc-33*, chez les rongeurs (TOAD-64 (Turned On After Division)), chez le rat et la souris (Unc-33 like phosphoprotein (Ulip)), chez l'humain (HULip) et chez *Drosophila melanogaster*. Il a également été proposé TUC pour TOAD-64/Ulip/CRMP mais cette nomenclature n'a pas été adoptée. DPYSLs (dihydropyrimidinase like) est parfois retrouvé comme nom de gènes codants les CRMPs. Le **Tableau IV.1** montre la nomenclature des CRMPs.

Les gènes *crmp* sont conservés au cours de l'évolution. Chez la drosophile, on retrouve seulement un gène unique *crmp* qui se situe sur le chromosome 3R dans la région 83 qui jouxte la région des gènes HOX responsables de la segmentation des axes antéro-postérieur et dorso-ventral. Le gène *crmp* a subi une évolution parallèle à celle des gènes HOX au cours de l'évolution des vertébrés. Il a été dupliqué et

se retrouve dans des régions paralogues chez l'homme. Les protéines CRMP1, 2, 3 et 4 présentent d'ailleurs 75% de similitude entre elles [393] et ont de fortes analogies biochimiques. Ces régions composent le cluster des gènes métaHOX qui regroupe des régions situées sur les chromosomes 4p, 8p ou 2p, 5q et 10q [394]. Le gène *crmp1* se trouve dans la région chromosomique 4p16, le gène *crmp2* en 8p21, le gène *crmp3* en 10q26, le gène *crmp4* en 5q32 et le gène *crmp5* en 2p23. D'un point de vue phylogénétique, *crmp5* est séparé des autres gènes *crmp*. En effet, la protéine CRMP5 présente seulement 50% d'homologie avec les quatre autres protéines CRMP [395]. Les gènes *crmp* appartiennent donc au cluster métaHOX. Parmi les cinq CRMPs, CRMP2 est le membre le plus étudié.

CRMP1	CRMP2	CRMP3	CRMP4	CRMP5
DPYSL1	DPYSL2	DPYSL4	DPYSL3	DPYSL5
Ulip3	Ulip2	Ulip4	Ulip1	Ulip6
DRP1	DRP2	DRP4	DRP3	DRP5
C22	TOAD-64		hUlip	CRAM

Tableau IV.1 : Nomenclature des CRMPs.

CRMP : Collapsin response mediator protein, DPYSL : Dihydropyrimidase-like protein, Ulip : uncoordinated 33-like protein, hUlip : human homolog of Ulip, DRP : Dihydropyrimidase related protein, TOAD-64 : turned on division after division 64 kDa protein, CRAM : cysteine-rich acidic transmembrane protein.

Figure et légende d'après (Tan et al., 2014).

Structure des CRMPs

La conservation de la séquence nucléotidique des gènes *crmp* au cours de l'évolution se traduit également par une conservation de la séquence peptidique des protéines CRMP issues de l'expression de ces gènes, ainsi que de leur structure tridimensionnelle. Celle-ci a d'abord été analysée au travers de CRMP1 par cristallographie en 2004 [396].

Cette étude a montré que la chaîne polypeptidique de CRMP1 consiste en deux domaines se présentant sous la forme d'une structure bilobée comparable à un « poumon ». L'étude de l'alignement de séquence des homologues CRMPs des vertébrés et invertébrés a permis de conclure que tous les membres des CRMPs partagent la même structure tridimensionnelle. La partie N-terminale, qui correspond au lobe supérieur du « poumon », est constituée d'un feuillet β de sept brins antiparallèles (S1 à S7, résidus 15-69). La partie C-terminale, correspondant au lobe inférieur, est composée d'hélices α (H1 à H19) et de feuillets β (S8 à S21) (résidus 70-490) dont le centre forme un tonneau TIM (alternance de huit hélices α (H1-H4, H7, H8, H12, H15) et huit feuillets β (S11-S17)). D'autres éléments de structure secondaire entourent ce centre dont certains contribuent à l'oligomérisation de CRMP1. Le lobe supérieur interagit avec le lobe inférieur grâce à des liaisons hydrogènes entre le brin S18 et S7 enveloppant ainsi les hélices α H16, H17, H18 et la boucle H18-S18 contre les brins β S1-S7.

L'analyse de la structure cristallographique de CRMP1 a également montré que les monomères étaient capables de s'oligomériser pour former des tétramères confirmant ainsi les études de double hybride chez la levure ou de gel-infiltration qui suggéraient que les CRMPs extraits du cerveau formaient des tétramères [397].

Les études de double hybride ont également permis de démontrer des préférences d'interaction entre les différents CRMPs. Ainsi, CRMP5 est capable de former des hétéro-oligomères avec CRMP2, CRMP3 et CRMP4 *in vitro* mais pas avec CRMP1, l'interaction entre CRMP1 et CRMP5 étant très faible [395]. De plus, l'oligomérisation de CRMP1, CRMP2 et CRMP3 se fait de préférence en hétérotétramères plutôt qu'en homotétramères [397]. Ces préférences s'expliquent en partie par l'analyse de la conservation de la séquence à l'interface des dimères. En effet, bien que 71% des résidus impliqués dans le contact des dimères soient conservés chez l'ensemble des CRMPs et que 84% des résidus qui contribuent à la tétramérisation soient également conservés chez les quatre CRMPs les plus proches (CRMP1 à CRMP4), quelques différences existent et celles-ci expliqueraient la préférence pour l'hétérotétramérisation [396].

De part l'interaction très faible entre CRMP1 et CRMP5, il a été proposé que ces deux protéines ne seraient pas retrouvées au sein d'un même tétramère [395]. Néanmoins, cela ne peut pas être exclu étant donné que les protéines diamétralement opposées d'un tétramère n'interagissent pas et qu'on ne peut pas exclure la possibilité que plus de deux membres des CRMPs soient présents au sein d'un hétérotétramère. Il est donc possible que deux membres des CRMPs montrant une faible interaction directe, tels que CRMP1 et CRMP5, puissent se retrouver au sein du même tétramère [396], [398].

La structure cristallographique de CRMP2 a également été obtenue en 2007 [399] (**Figure IV.1**). Celle-ci est très proche de CRMP1 avec quelques différences mineures dans la conformation du tétramère. Cette étude a également mis en évidence la présence d'une cavité chez CRMP1 et CRMP2 qui correspond à la position du site catalytique retrouvé chez les DHPase. Néanmoins les résidus catalytiques ne sont pas conservés chez les CRMPs, cette poche pouvant toutefois servir à l'interaction avec des petites molécules. Une indication de ce potentiel d'interaction avec un ligand est la présence d'ion Ca^{2+} dans la cavité de CRMP2. Cependant, les régions entourant la cavité sont celles qui sont le moins conservées entre CRMP1 et CRMP2 ce qui suggère qu'il n'y ait pas de pression de sélection pour la conservation ou la formation des différentes cavités chez les CRMPs.

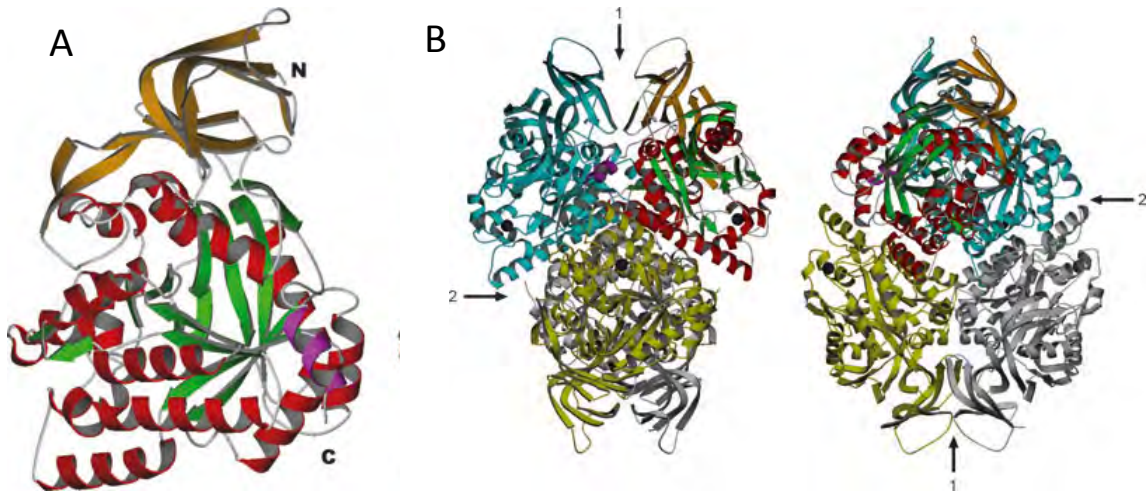


Figure IV.1 : Structure cristallographique de CRMP2.

A Structure du monomère. Le petit domaine en N-terminale est montré en jaune, le tunnel TIM en vert/rouge, l'hélice C-terminale en magenta.

B Structure du tétramère de CRMP2. Visualisation selon deux vues avec une rotation de 90°. La localisation des deux interfaces est montrée à l'aide des flèches.

Figure et légende d'après (Stenmark et al., 2007).

La structure cristallographique de CRMP5 a ensuite été obtenue en 2013 [398]. Cette étude a également permis de mieux caractériser les préférences d'homotetramérisation des CRMPs. Tout d'abord, il a été montré que les cations bivalents tels que Ca^{2+} et Mg^{2+} favorisent la formation de l'homotetramère de CRMP2 en stabilisant les monomères. En revanche, l'homotetramère de CRMP1 et CRMP5 ne semble pas être favorisé par la présence de ces cations (Figure IV.2).

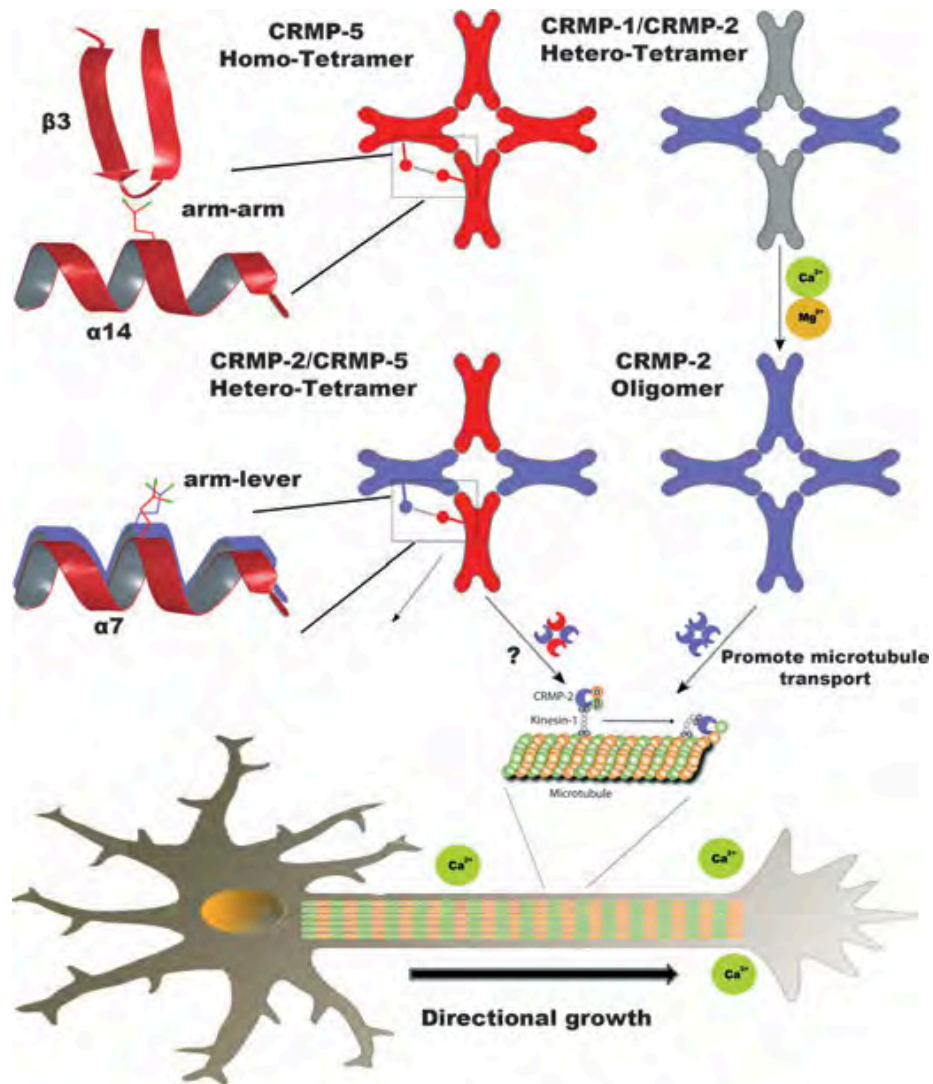


Figure IV.2 : Oligomérisation des CRMPs.

Dans les conditions physiologiques CRMP5 (en rouge) peut former des homotétramères qui sont stabilisés par les interfaces « arm-arm » et « arm-lever ». CRMP5 forme préférentiellement des hétérotétramères avec CRMP2 (en violet) plutôt qu'avec CRMP1 (en gris) et cette interaction est stabilisée par des liaisons hydrogène formées sur l'hélice $\alpha 7$. Les homo et hétérotétramères de CRMP2 et CRMP5 peuvent avoir différentes affinités avec leurs protéines cibles. Les ions Ca^{2+} et Mg^{2+} stabilisent les homotétramères de CRMP2 régulant ainsi la croissance des neurones.

Figure et légende d'après (Petratos et Lee., 2013).

De plus, l'étude a également permis d'identifier deux interfaces d'interaction entre deux monomères qui permettent la formation de dimère. La première interface, appelée « arm-lever », correspond aux résidus 483 à 492 qui forment une boucle étendue capable de former des liaisons hydrogènes et des ponts salins avec l'autre monomère. La deuxième interface, appelée « arm-arm », comprend 16 à 18 liaisons hydrogènes et ponts salins. Ces deux interfaces permettent ainsi la stabilisation et la conservation de l'intégrité structurale de l'oligomère.

La structure globale de CRMP5 est très similaire à celle de CRMP1 et CRMP2, cependant, les différences observées permettent de comprendre la préférence de l'oligomérisation de CRMP5 avec CRMP2 plutôt que CRMP1. En effet, sur la base des données précédentes, l'étude a identifié des résidus au niveau des deux interfaces du dimère qui sont, dans les homotétramères, moins bien positionnés et forment donc des interactions plus faibles ce qui jouerait un rôle dans la discrimination entre la formation d'homo ou d'hétérotétramères. De même, certains résidus cruciaux pour la formation de liaisons dans les deux interfaces ne sont pas optimisés pour former des interactions entre CRMP1 et CRMP5 par rapport à CRMP1 et CRMP2 (exemple : modifications de résidus dans CRMP1, par rapport à CRMP2, qui empêchent la formation de liaisons hydrogènes pour stabiliser les interfaces). Ces résultats confirment donc la faible interaction entre CRMP1 mais montrent que CRMP5 apparaît comme un partenaire d'interaction de CRMP2 qui entre en compétition avec CRMP1.

L'un des aspects critique non résolu par les études structurales des CRMPs est l'intégrité de la partie C-terminale (les 84 derniers résidus), non présente dans ces études car elle ne présente pas de structure 3D [400]. Bien que cette région ne soit pas nécessaire à l'oligomérisation des CRMPs (puisque'il a été montré que la région N-terminale 8-134 et 281-435 est essentielle et suffisante pour l'oligomérisation), elle joue pourtant un rôle important sur la fonction biologique des CRMPs. En effet, elle contient de nombreux sites de phosphorylation régulés par de nombreuses kinases et le clivage de cette région par Calpain affecte la fonction des CRMPs. Une étude a montré que la présence de la partie C-terminale de CRMP1 induisait de légères modifications de sa structure ce qui suggère un rôle de celle-ci dans la dynamique et la fonction de CRMP1 [401].

En plus de son domaine de liaison aux microtubules, CRMP2 possède également un domaine de liaison à la chaîne lourde de la dynéine et un à la chaîne légère de la kinésine. Ces domaines n'ont pas été décrits chez les autres membres mais compte tenu de la forte homologie de séquence, leur présence n'est pas à exclure.

Fonctions physiologiques des CRMPs

Les fonctions des CRMPs dans les cellules neuronales ont majoritairement été décrites au travers de CRMP2. Les rôles majeurs des CRMPs sont : le guidage axonale, l'extension des neurites ainsi que le développement, la plasticité et la polarité neuronale. L'ensemble de ces actions passe très majoritairement par la voie de signalisation SemaA3 qui va aboutir à la phosphorylation des CRMPs et va ainsi induire un remodelage du cytosquelette (**Figure IV.3**). En effet, les protéines CRMPs sont des MAP, elles sont donc capables de réguler la polymérisation et la stabilité des microtubules. Certaines études montrent également que certains CRMPs sont également capables de réguler le réseau d'actine indépendamment de la voie Sema3A. En plus de son rôle dans la stabilisation des microtubules, CRMP2 est également capable de réguler la croissance axonale via le trafic vésiculaire. CRMP2 possède également d'autres fonctions, il joue notamment un rôle dans le relargage de neurotransmetteurs. Enfin, certains CRMPs sont liés à la migration cellulaire dans des cellules non neuronales.

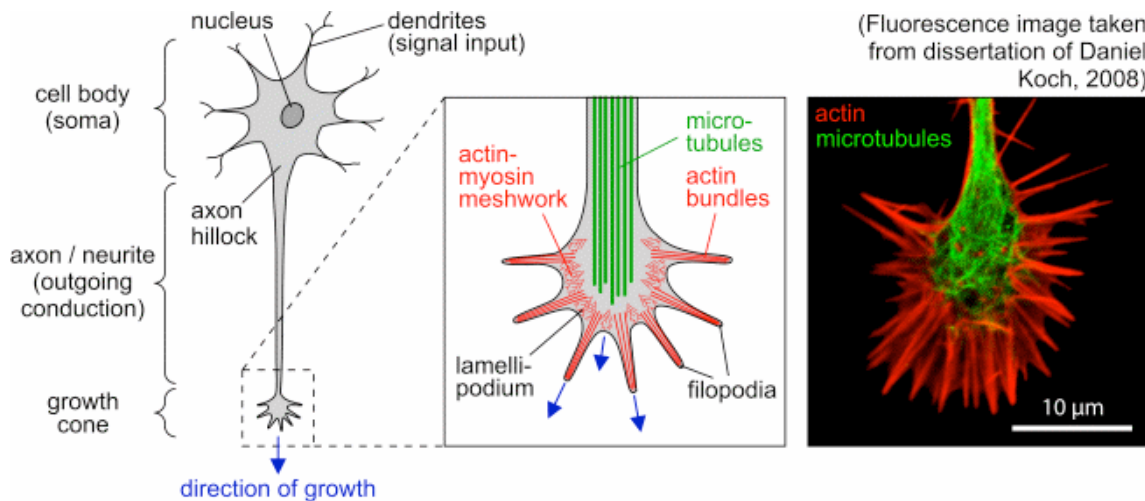


Figure IV.3 : Représentation schématique d'un neurone et de la composition des éléments du cytosquelette dans le cône de croissance.

L'extrémité du cône de croissance est constituée d'un réseau d'actine avec la présence de lamellipodes et de filopodes tandis que les microtubules se situent le long du prolongement des neurites et au centre du cône de croissance où ils interagissent avec l'actine (schéma au centre et immunofluorescence à droite). La régulation de la dynamique des réseaux d'actine et de microtubules est importante pour l'extension des neurites et le guidage axonal. Une des voies majeures qui assure le guidage axonal est la voie des sémaphorines dans laquelle les CRMPs (Collapsin Response mediator protein family) sont impliqués.

Image adaptée du site internet :

<http://home.uni-leipzig.de/pwm/web/section=introduction&page=neurons>

Implication des CRMPs dans la voie Sema3A

Tous les CRMPs, à l'exception de CRMP3, sont impliqués dans la croissance et le guidage axonale via la voie Sema3A. Les CRMPs sont des molécules transductrices du signal de l'effondrement du cône de croissance induit par Sema3A. Sema3A fait partie de la famille des sémaphorines qui participent au positionnement des neurones, à la formation des faisceaux d'axones et au guidage des axones et des dendrites au cours du développement [402]. Chez l'adulte, les sémaphorines seraient également impliquées dans l'inhibition de la régénération axonale après lésion [403], [404]. Sema3A provoque l'effondrement du cône de croissance des axones par sa fixation sur son complexe récepteur Neuropiline-1 (NP-1) associé à Plexine A1 (PlexA1) [405]. La partie intracellulaire de PlexA1 transduit le signal de Sema3A via la kinase Fyn qui va aboutir à l'activation d'autres kinases telles que ROCK et Cdk5 qui vont, à leur tour, phosphoryler les CRMPs et induire la réorganisation du cytosquelette et l'endocytose au lamellipode du cône de croissance [406], [407]. En absence de ligand sur le récepteur NP-1, PlexA1 est inhibé par phosphorylation via la kinase Fes.

La fonction des CRMPs dans le guidage axonal n'est pas restreinte à la signalisation Sema3A. Le facteur LPA (lysophosphatidic acid) de même que la signalisation ephrin-A5 sont capables de stimuler la phosphorylation de CRMP2 sur le T555 par ROCK et de provoquer l'effondrement du cône de croissance [408].

Implication des CRMPs dans la dynamique des microtubules

Un des effets majeurs des CRMPs, induit par la voie de signalisation Sema3A, est la régulation de la polymérisation et de la stabilité des microtubules [409], [410]. Une étude récente a montré que CRMP2 favorisait la polymérisation et la stabilité des microtubules selon deux processus distincts : Tout d'abord, CRMP2 interagit avec les dimères de tubuline-GTP soluble qui va permettre l'incorporation de ce dimère à l'extrémité plus des microtubules favorisant ainsi la polymérisation. D'autre part, CRMP2 interagit avec les dimères de tubuline-GTP à l'extrémité plus du microtubule pour permettre sa stabilisation [411]. Il a également été montré, par immunoprécipitation, que CRMP2 serait capable d'interagir avec la stathmine qui est une protéine déstabilisatrice des microtubules. Bien qu'aucun rôle n'ait été mis en évidence dans l'interaction de CRMP2 avec la stathmine, il pourrait s'agir d'un autre mécanisme de régulation de la dynamique des microtubules par CRMP2 [393]. Bien que le mécanisme n'ait pas été aussi étudié pour les autres CRMPs, ils sont néanmoins tous impliqués dans la régulation de la dynamique des microtubules.

Implications des CRMPs dans le remodelage de l'actine

De nombreuses études ont également mis en évidence un remodelage du cytosquelette d'actine par certains CRMPs, que ce soit pour le développement du cône de croissance ou pour d'autres fonctions. CRMP2 est, par exemple, capable d'interagir avec la protéine CaM (Ca²⁺-binding protein) [412]. Cette interaction inhibe l'homotétramérisation de CRMP2, diminue la capacité de clivage par Calpain et réduit la capacité de CRMP2 à induire la formation de filaments d'actine [412]. D'autres CRMPs, sont également capable de réguler le réseau d'actine. Il a été montré que CRMP4 interagissait avec RhoA pour réguler la dynamique des filopodes via la modulation de l'actine et médier l'inhibition de l'extension des neurites [413]. De même, il a été montré que CRMP4 permet l'assemblage de faisceaux d'actine *in vitro* qui composent le lamellipode *in vivo*, ce qui suggère que CRMP4 serait impliqué dans l'effondrement du cône de croissance via son rôle dans la régulation du réseau d'actine [414]. Une autre étude a montré que CRMP2 et CRMP4 forment des complexes qui lient les microtubules et l'actine pour médier la coordination de ces deux réseaux et réguler le développement du cône de croissance et l'élongation de l'axone [415]. Une colocalisation partielle de CRMP2 avec les filaments d'actine et les microtubules au niveau du cône de croissance a également été observée dans une autre étude [416]. CRMP1 régule également le réseau d'actine en modulant l'activation du complexe Arp2/3 chez la bactérie *Listeria* [417]. De même, une isoforme de CRMP1 (L-CRMP1 ou CRMP1-A), promeut la formation de filopodes en interagissant avec WAVE-1 [418], [419]. Cette isoforme agit également en aval de cdc42 (famille rho) qui est impliqué dans la réorganisation du cytosquelette d'actine [418]. Enfin, il a été montré que CRMP5 régule la dynamique des filopodes dans les neurones [420].

Implication de CRMP2 dans le trafic vésiculaire

En plus de son rôle dans la régulation des microtubules, CRMP2 affecte également les neurites via son rôle dans le transport antérograde. CRMP2 sert d'adaptateur entre la kinésine et des cargos qui contiennent des protéines régulatrices de synapse telles que TrkB (52) ou le complexe Sra1/WAVE1 (53). Dans la partie distale de l'axone de la synapse, WAVE1 active le complexe Arp2/3 qui provoque à son tour la nucléation des monomères d'actine pour former un réseau d'actine branché. Le transport de Sra1/WAVE1 via CRMP2 est essentiel pour la préservation de l'intégrité du réseau d'actine distal et la croissance axonale (53). De même, il a été montré que CRMP2 associé à la kinésine régulait le transport de la tubuline soluble au niveau de la partie distale du cône de croissance [421]. De plus, CRMP2 adapte

la kinésine à des protéines liées aux vésicules d'endocytose telles que Numb, impliqué dans l'internalisation et le tri des protéines à la surface de la membrane plasmique [422]. Peu de choses sont connues sur le rôle de CRMP2 dans le trafic vésiculaire comparé à son rôle dans le transport axonal bien que ces deux processus soient très largement analogues en termes de fonctions de CRMP2 sur les microtubules et la kinésine.

Il a également été montré que CRMP2 interagit avec la chaîne lourde de la dynéine et inhibe le transport rétrograde dans les neurones ce qui pourrait affecter également la formation de l'axone et le développement neuronal [423]. De plus, une autre étude a permis de mettre en évidence un rôle de CRMP2 dans le trafic vésiculaire de cellules non neuronales (Hela) en régulant l'endocytose via l'adaptation de MICAL-L1 avec la dynéine [424].

Implications de CRMP2 dans le relargage de neurotransmetteurs

CRMP2 est également capable d'interagir avec CaV2.2 (canaux calciques de type N) [425], [426]. L'étude a montré que l'interaction directe entre CRMP2 et CaV2.2 augmente la surface cellulaire du trafic de CaV2.2 de même que la densité de calcium ce qui augmente non seulement le relargage du neurotransmetteur glutamate et le recyclage des vésicules synaptiques mais impacte également la croissance axonale de neurones de l'hippocampe. Dans les neurones sensoriels, CRMP2 s'associe également avec CaV2.2 pour permettre le relargage du neurotransmetteur CGRP (62). La protéine NF1 (neurofibromin 1) est également capable d'interagir avec CRMP2, ce qui augmente la phosphorylation de CRMP2 et empêche CRMP2 d'interagir avec CaV2.2 bloquant ainsi le relargage de neurotransmetteurs [427].

La **Figure IV.4** présente un schéma récapitulatif des rôles de CRMP2 dans les neurones.

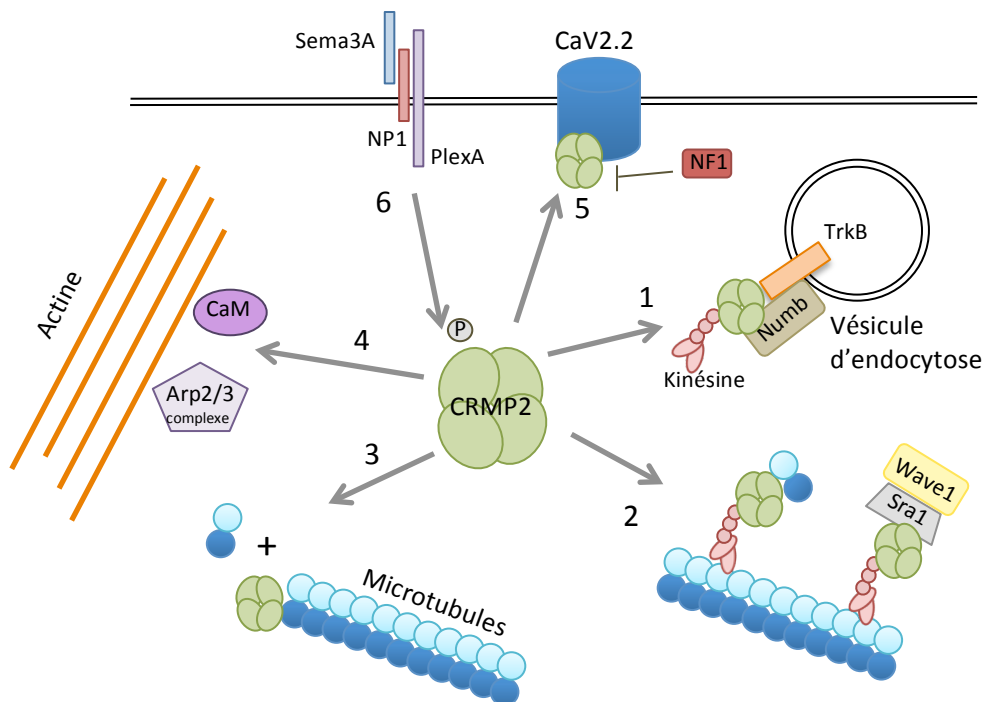


Figure IV.4 : Rôle de CRMP2 dans les neurones.

Modèle de la réponse de l'activation de la voie Sema3A médiée par CRMP2.

- 1) CRMP2 est impliqué dans le transport de protéines contenues dans des vésicules comme TrkB en servant d'adaptateur entre la kinésine et d'autres protéines telles que Numb.
- 2) CRMP2 interagit également avec la kinésine pour transporter les dimères de tubuline ou bien le complexe Sra1/WAVE1 à l'extrémité du cône de croissance.
- 3) CRMP2 favorise la polymérisation et la stabilité des microtubules.
- 4) CRMP2 module la dynamique du réseau d'actine. L'interaction de CRMP2 avec le complexe Sra-1/WAVE1 permet le recrutement du complexe Arp2/3 au cône de croissance et la régulation de la dynamique de l'actine. CRMP2 interagit également avec CaM et celle-ci inhibe la capacité de CRMP2 à former des filaments d'actine.
- 5) CRMP2 interagit avec CaV2.2 et induit le relargage de neurotransmetteurs.
- 6) La voie Sema3a induit la phosphorylation de CRMP2 et module ainsi ses fonctions.

Implication de CRMP2 dans la migration de cellules non neuronales

L'analogie entre le cône de croissance et une cellule en cours de migration est forte en terme d'organisation des éléments du cytosquelette, avec à l'avant de la cellule le réseau d'actine composé d'un lamellipode et de filopodes tandis que les microtubules contrôlent la rétraction de l'arrière de la cellule et permettent le transport de molécules impliquées dans la migration cellulaire via le trafic vésiculaire (voir [Figure I.6](#) chapitre I). CRMP2 étant un modulateur de la dynamique des microtubules et de l'actine dans le cône de croissance, il n'est donc pas surprenant que cette protéine est également un rôle dans la migration cellulaire de cellules non neuronales.

Il a été montré que CRMP2 est impliqué dans la migration des lymphocytes T. Pour migrer, les lymphocytes doivent être polarisés avec un pôle correspondant au front de migration au l'autre pôle appelé uropode, qui possède des fonctions de motilité et d'adhérence, correspondant à l'arrière de la cellule. L'acquisition de cette polarisation nécessite des modifications morphologiques drastiques de la cellule qui sont permises via un remodelage du cytosquelette. CRMP2 est exprimé d'une façon homogène dans le cytoplasme des lymphocytes T, cependant lors de leur polarisation induite par l'IL-2, CRMP2 est relocalisé au niveau des uropodes où il colocalise et interagit avec la vimentine (composant des filaments intermédiaires). Il a été montré que CRMP2 avait une fonction importante dans la polarisation et la migration des lymphocytes T. CRMP2 participerait à la polarisation et à la migration en induisant le remodelage du cytosquelette d'actine, de microtubules et des filaments intermédiaires dans les lymphocytes T. Une autre étude a montré que l'induction de la polarisation et de la migration des lymphocytes T via CXCL12 diminue la phosphorylation de CRMP2 sur les résidus T509 et T514 (phosphorylés par GSK-3 β) et augmente la phosphorylation sur le Y479 (phosphorylé par Yes). La phosphorylation sur le Y479 de CRMP2 est importante pour la migration des lymphocytes T. Il a également été montré que l'infection virale des lymphocytes T par le HTLV-1 (retrovirus human T leukemia virus-1) augmente la migration des lymphocytes T en augmentant l'activité de CRMP2 [428]–[430]. Enfin, Il a été montré que dans les fibroblastes embryonnaires de souris, le PDGF (Platelet Derived Growth Factor) induit la déphosphorylation de CRMP2 sur le T514. Cette déphosphorylation est nécessaire à la migration induite par le PDGF suggérant que CRMP2 a un rôle dans ce processus au cours du développement embryonnaire [431].

D'autres membres des CRMPs sont également impliqués dans la migration cellulaire. Le rôle des CRMPs dans ce processus les implique également dans le développement tumoral. Ces dernières années, plusieurs études ont montré une corrélation entre l'expression de différents CRMPs et le développement tumoral. Ces résultats seront détaillés dans la partie « expression des CRMPs dans les cancers ».

Implication de CRMP3 dans les neurones

Bien que CRMP3 ne soit pas régulé par la voie SemaA3, la protéine a tout de même un rôle dans l'extension des neurites. En effet, il a été montré que CRMP3 inhibe la polymérisation des microtubules et la croissance des neurites dans des neurones granulaires du cervelet [432]. De plus, CRMP3 est impliqué dans la mort neuronale [432], [433]. CRMP3 joue également un rôle dans l'organisation, la plasticité et la morphogénèse des dendrites [434], [435]. Il a été montré que CRMP3 joue un rôle sur l'influx de Ca²⁺ et médie la croissance dendritique dans les neurones de l'hippocampe [436]. Enfin, la voie de signalisation PLC/PKC a été identifiée comme une des voies modulant l'activité de CRMP3 [437].

Implication de CRMP5 dans les neurones

De façon générale, CRMP5 antagonise beaucoup de fonctions des autres CRMPs soit en interagissant avec eux ou bien par compétition en interagissant avec leurs partenaires. Il a, par exemple, été montré que CRMP5 entre en compétition avec CRMP2 pour interagir avec les dimères de tubuline, ce qui bloque le transport de la tubuline et arrête ainsi la polymérisation des microtubules et l'extension des neurites [438]. De même, CRMP5 et CRMP1 ont également des effets antagonistes, CRMP5 régule négativement tandis que CRMP1 stimule la prolifération des progéniteurs neuraux dans la région de l'hippocampe dans le cerveau adulte de souris [439].

Régulations des CRMPs

Isoformes et clivages

Les protéines CRMP1-4 possèdent chacune deux isoformes, une forme longue CRMP-As et une forme courte CRMP-Bs, issues de l'épissage alternatif du premier exon codant modifiant la partie N-terminale [416] (**Figure IV.5A et B**). Ces isoformes peuvent avoir des profils d'expression différents ainsi que des fonctions cellulaires différentes voir antagonistes. En effet, les deux isoformes de CRMP2, CRMP2-A et CRMP2-B, ont des effets opposés sur l'organisation des microtubules et la croissance axonale ce qui indique que l'extension de la partie N-terminale a une importance fonctionnelle dans la régulation de l'activité de CRMP2 [416]. De plus, il a été montré que CRMP2-A interagit avec ROCKII et l'inhibe tandis que CRMP2B n'est pas capable d'interagir avec ROCKII [440], [441]. Comme décrit précédemment, CRMP1-A a une activité régulatrice sur le remodelage du cytosquelette d'actine que ne possède pas CRMP1-B [418], [419]. Enfin, CRMP4-A et CRMP4-B ont des effets opposés sur la prolifération cellulaire, la migration et l'invasion dans le cancer gastrique (voir la partie « Expression des CRMPs dans les cancers ») [442]. D'autres isoformes de 62 et 66 kDa dérivées de CRMP2-B (64 kDa) ont également été détectées dans le cerveau embryonnaire de souris et de rat [443] (**Figure IV.5C**). Cependant, la fonction et l'expression spatio-temporelle de ces différentes isoformes n'ont pas été identifiées.

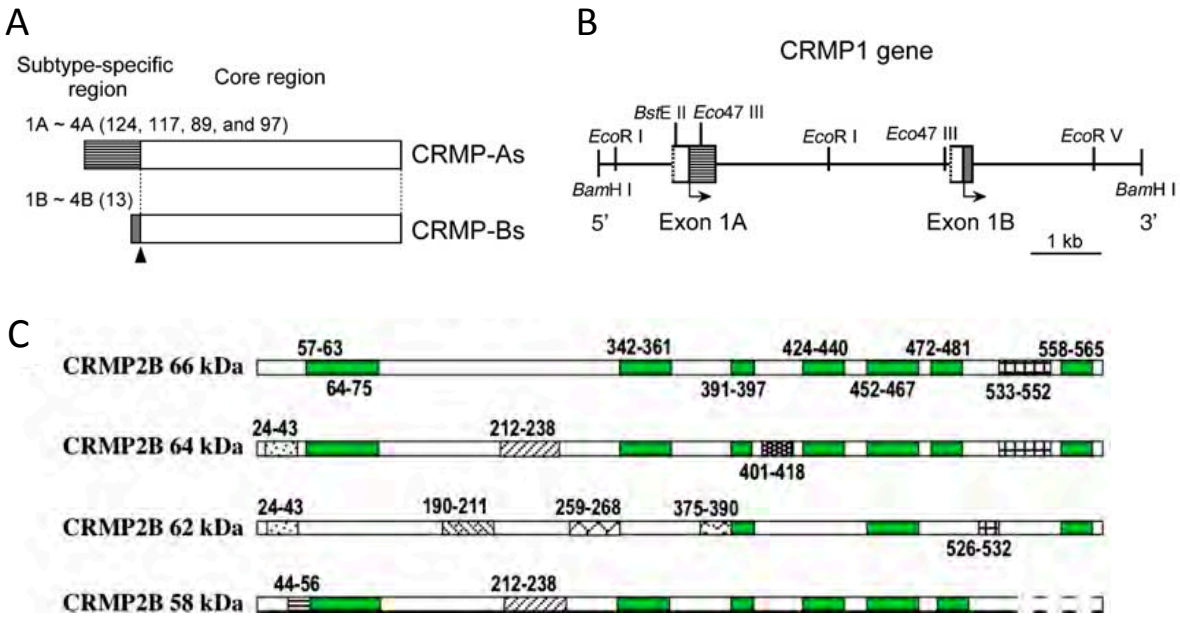


Figure IV.5 : Caractérisation des deux isoformes des CRMPs.

A Schéma des CRMP-As et CRMP-Bs. La partie grisée correspond à la région N-terminale spécifique des deux isoformes A et B de CRMP1-4.

B Carte de restriction du fragment de 7,6 kb de BamHI dans le génome de souris contenant le premier exon codant pour CRMP1A et CRMP1B.

C Les différentes isoformes de CRMP2 de 58, 62, 64 et 66 kDa ont été analysées par spectrométrie de masse (MALDI-TOF). Les séquences partagées par au moins trois isoformes sont indiquées en vert. Les régions hachurées sont des régions qui divergent entre les différentes isoformes.

Figure et légende d'après (Yuasa-Kawada et al., 2003) (Rogemond et al., 2008).

De plus, il a été montré *in vivo* que la protéase Calpain clive spécifiquement la partie C-terminale des CRMPs produisant ainsi des protéines de 55 à 58 kDa [444]. Ces protéines tronquées ont différents effets sur la croissance axonale et induisent même parfois la mort cellulaire après translocation dans le noyau [444]–[446]. En effet, il a été montré que le clivage de CRMP3 par Calpain induit sa translocation dans le noyau ce qui va aboutir à la condensation nucléaire via la déacétylation de l'histone H4 provoquant la répression de la transcription du gène E2F1 et la mort des neurones [433]. De plus, il a été récemment montré que le clivage de CRMP2 par Calpain provoquait la dégénérescence de l'axone [447] et qu'il était important pour l'interaction avec les microtubules [448]. La forme clivée de CRMP2 correspond à une protéine de 58 kDa qui est également retrouvée dans le noyau car le clivage permet de démasquer un NLS (nuclear localization signal). Cette protéine est uniquement retrouvée dans le cerveau de souris et rat au cours du développement embryonnaire et après la naissance mais pas chez l'adulte. Cette isoforme inhibe l'extension des neurites [443]. Enfin, Une étude a montré qu'une ischémie cérébrale induisait l'activation de Calpain ce qui aboutit au clivage des CRMPs. Les CRMPs clivés peuvent donc jouer un rôle dans la mort des neurones à la suite d'une ischémie cérébrale [449], [450].

Bien que peu de choses soient connues sur les effets directs du clivage de la partie C-terminale sur la structure des CRMPs il est fort probable que celle-ci joue un rôle majeur dans les interactions des CRMPs avec leurs partenaires.

Régulation par phosphorylation

Les CRMPs sont phosphorylables sur de nombreux résidus dont la plupart se situent dans la partie C-terminale et certains sites sont conservés entre les différents membres.

Les sites T509, T514 et S518 sont phosphorylables par la kinase GSK-3 β et sont présents chez CRMP1, CRMP2 et CRMP4. CRMP5 possède les sites T509 et T514 mais pas le S518. Le site S522 est phosphorylable par Cdk5 et est également présent chez CRMP1, CRMP2 et CRMP4. La phosphorylation de S522 par Cdk5 est nécessaire à la phosphorylation séquentielle des résidus T509, T514 et S518 par GSK-3 β . L'absence de ces résidus phosphorylés par GSK-3 β et Cdk5 chez CRMP3 explique que ce membre ne soit pas régulé par la voie Sema3A. Le site T555 est phosphorylé par ROCK et ce site est uniquement retrouvé chez CRMP2. La kinase CAMKII a également été montrée comme étant capable de phosphoryler CRMP2 bien que le site de phosphorylation n'ait pas été identifié [451]. Le résidu S465 a été identifié comme site de phosphorylation de CRMP2 dans le cerveau de souris et n'est pas conservé chez les autres membres [452] néanmoins, CRMP5 a un T à cette position potentiellement phosphorylable. CRMP2 possède également de nombreuses tyrosines phosphorylables : Y32, Y251, Y275, Y431, Y479 et Y499 [453]. Y32 est phosphorylé par Fyn et Fes, Y479 par Yes et Fer et Y504 par Fyn. Bien que la phosphorylation de ces résidus n'ait pas été mise en évidence chez les autres membres, les tyrosines 32, 251, 431 et 479 sont conservées chez CRMP1, CRMP3 et CRMP4. Le résidu Y499 est également présent chez CRMP1 et CRMP4.

Des résidus phosphorylables présents spécifiquement chez d'autres membres ont également été identifiés. C'est le cas, du Y504 chez CRMP1 qui est phosphorylé par Fyn et du T516 (phosphorylé par GSK-3 β) et S534 chez CRMP5 [438]. La **Figure IV.6** montre l'ensemble des sites de phosphorylation présents chez CRMP2.

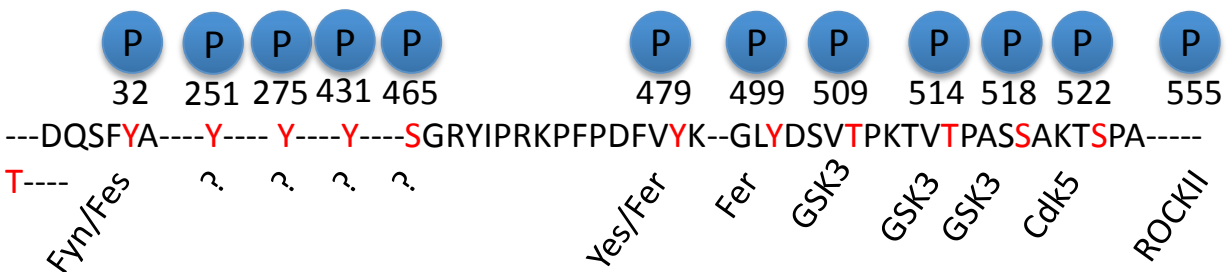


Figure IV.6 : Schéma des sites de phosphorylation de CRMP2.

Séquence de CRMP2. Les sites de phosphorylation de CRMP2 sont indiqués en rouge avec leur position et les kinases responsables de leur phosphorylation.

Y : tyrosine

S : sérine

T : thréonine

? : kinase non identifiée

Plusieurs voies de signalisation distinctes régulent la phosphorylation des CRMPs afin de moduler leur capacité d'interaction avec ses partenaires pour soit provoquer l'effondrement du cône de croissance ou, au contraire, l'extension de l'axone. La phosphorylation par GSK-3 β , Cdk5, ROCK, CAMKII et Fyn induit la rétraction du neurite et l'effondrement du cône de croissance. La phosphorylation par GSK-3 β et/ou ROCK diminue la capacité d'interaction avec la tubuline provoquant ainsi l'arrêt de la croissance axonale et l'effondrement du cône [454], [455], [456]. De même, la phosphorylation par GSK-3 β diminue la capacité d'interaction de CRMP2 avec Numb [422]. Une étude a également montré que la phosphorylation par Cdk5 était essentielle pour l'arrangement des cellules dendritiques *in vivo* [457]. La déphosphorylation de CRMP2 par des phosphatases induit la croissance du neurite [458], [459]. Deux phosphatases PP1 et PP2A ont été décrites comme pouvant déphosphoryler CRMP2 sur les sites T509 et T514 [460]. Il a également été montré que la phosphorylation de CRMP2 sur la Y479 change la structure de CRMP2 et change son oligomérisation [448]. Dans ce sens, il a été montré que la phosphorylation de CRMP2 provoque de légers changements de conformation dans la partie C-terminale qui modifient la charge à la surface ce qui altèrent les interactions au sein du tétramère mais également altèrent l'interaction avec la tubuline [461].

Régulation par Glycosylation

CRMP2 subit également des O-glycosylations [462], [463] et la prédiction des sites de glycosylation (NetOGlyc) suggère fortement que le(s) site(s) de glycosylation se situe(nt) également dans la partie C-terminale de la protéine. Les effets de la glycosylation de CRMP2 n'ont pas encore été définis mais il est possible qu'ils régulent les interactions avec des ligands et/ou la phosphorylation [399].

Régulation de la composition des tétramères

Bien que l'importance fonctionnelle de la composition en homo et/ou homotétramères ne soit pas encore bien définie, cette composition doit également être cruciale pour la régulation de leur fonction et de leur interaction avec d'autres protéines. Cette régulation a déjà été décrite pour CRMP2 qui se dissocie en monomères lorsqu'il interagit avec la tubuline et la calmoduline [410], [412]. Une hypothèse serait que la formation d'hétérotétramères permettrait d'avoir une forte proximité des parties C-terminales des différents membres. Cette région est la moins conservée et permettrait aux CRMPs d'interagir avec des partenaires communs ou différents de manière précise et finement contrôlée.

Une étude a montré qu'il existe une modulation de la croissance axonale en corrélation avec l'oligomérisation des CRMPs. La mutation D58N de UNC-33 chez *C. elegans* cause une paralysie due à un défaut de la croissance axonale [464]. Cette mutation ralentit l'oligomérisation de UNC-33 et son interaction avec UNC-14 (RUN domain protein) et la kinésine [465]. Le D58 est conservé chez les CRMPs (D64 pour CRMP5 et D71 pour CRMP1-4). Les effets observés chez UNC-33 et CRMP2 ne sont sûrement pas dus à une interférence directe de l'oligomérisation mais à un effet indirect causé par la déstabilisation des monomères.

Une autre étude a montré que la substitution d'alanine des résidus 367-368 et 487-489 de CRMP1 chez la souris produit une protéine inactive, bien que la capacité d'interaction avec la plexin A1 soit

conservée. Ces résidus sont localisés à proximité de l'interface « arm-arm » et pourraient déstabiliser le tétramère [396].

Régulation transcriptionnelle

En plus de la régulation post-traductionnelle, un contrôle de la transcription de CRMP2 a également été décrit. La suppression transcriptionnelle de CRMP2 par la signalisation BMP en aval du facteur de transcription SMAD1 a été démontrée et implique CRMP2 comme jouant un rôle essentiel dans de nombreuses étapes du développement neuronal [466]. De plus, GDNF augmente la transcription de CRMP2 via la voie de signalisation GDNF/RET (tyrosine kinase) et cette induction est dépendante de la voie ERK [467]. L'analyse du promoteur de CRMP2 montre que les facteurs de transcription tels que Sp1, E2F, et GATA-1/2, pourraient également réguler la transcription de CRMP2 [467].

Expressions des CRMPs

Expression des CRMPs au cours du développement

L'ensemble des cinq gènes *crmp* ont été décrits comme étant très fortement exprimés au cours du développement. Dans l'embryon de xénope, l'expression de la protéine CRMP2 débute au milieu du stade gastrula. CRMP2 est ensuite exprimé de façon ubiquitaire dans tout l'embryon. A partir du stade neurula, la synthèse de CRMP2 se poursuit exclusivement dans les tissus nerveux. CRMP2 est alors exprimé lors de la formation de la plaque et du tube neural. A des stades ultérieurs, CRMP2 est ensuite exprimé dans le cerveau, la moelle épinière et les yeux [35].

Dans le cerveau de rat en développement, il a été mis en évidence une forte expression des CRMPs selon un profil d'expression spatio-temporel différent pour chaque CRMPs. CRMP2 est le plus largement exprimé dans le système nerveux, CRMP1 et CRMP4 sont exprimés à certaines étapes du développement neuronal et sont absents des tissus adultes. CRMP3 a une distribution distincte, il est exprimé de façon transitoire au cours de développement de la moelle épinière et de façon sélective dans le cervelet après la naissance [468].

Expression des CRMPs chez adulte

Chez la souris, l'expression des protéines CRMPs est maximale durant la première semaine après la naissance, lorsque la maturation des neurones et les connections synaptiques sont très actives [393], [469]. Chez les rongeurs, dans le cerveau adulte, l'expression des CRMPs chute de manière drastique, mais subsiste dans des zones de forte neurogénèse et/ou plasticité telles que le bulbe olfactif, l'hippocampe et le cervelet. CRMP1 est principalement détecté dans les cellules de Purkinje du cervelet [470]. Parmi les CRMPs, CRMP2 est la protéine dont le taux de synthèse dans le cerveau adulte est le plus élevé [470]. CRMP2 est particulièrement détecté dans le système olfactif [471], dans l'hippocampe et le cervelet [470]. CRMP3 est mis en évidence dans les cellules de la couche granulaire du cervelet, l'olive inférieure et le gyrus denté de l'hippocampe de la souris [391]. CRMP4 est également présent dans le bulbe olfactif, l'hippocampe en formation et dans les cellules de la couche granulaire inférieure chez le rat [472]. CRMP5 est exprimé dans quelques neurones post-mitotiques du bulbe olfactif, dans l'épithélium olfactif et dans le gyrus denté de l'hippocampe chez le rat [392].

Expression des CRMPs dans les maladies neurologiques

Etant donné l'importance des CRMPs dans le développement du système nerveux, leur implication dans des maladies neurologiques n'est pas surprenante. Des variations d'expression des protéines CRMPs sont retrouvées dans de nombreux troubles mais bien que leur implication soit clairement établie, leur rôle exact dans ces maladies est encore mal connu.

Il a été montré que CRMP2 est hyperphosphorylé dans le cerveau des patients atteints de la maladie d'Alzheimer [473]. Bien que le rôle de CRMP2 dans cette maladie ne soit pas encore bien compris, il a été proposé qu'il serait lié à la dérégulation du transport des endosomes [422]. CRMP4 est également suspecté d'être impliqué dans la maladie d'Alzheimer [474].

CRMP2 serait également impliqué dans la maladie de Parkinson et participerait à l'apoptose neuronale induite par le neurotransmetteur dopamine [475] via la voie Akt/ GSK-3 β /CRMP-2 venant ainsi à la dégénérescence de l'axone [476]. CRMP2, qui affecte le relargage de neurotransmetteurs en modulant le flux de Ca²⁺ via l'activation des récepteurs NMDA [425], a également été identifié comme gène de susceptibilité de la Schizophrénie. De plus, il a également été montré que l'altération de la transcription de CRMP2 et/ou de sa traduction augmente le risque de développer la maladie. La diminution de l'expression du gène *crmp2* serait modulée par la voie mTOR [477]. CRMP1 et CRMP4 sont également impliqués dans le développement de la Schizophrénie [478]. L'expression de CRMP2 diminue dans le cerveau des patients atteints de dépression [479]. De même, la diminution de l'expression de CRMP2 dans le cortex frontal et l'hippocampe a également été observée chez des patients atteints de trouble bipolaire [479], [477]. CRMP5 pourrait également être impliqué dans la dépression [480] et CRMP4 dans la bipolarité [481]. CRMP2 serait également impliqué dans les douleurs neuropathiques et dans la neurofibromatose de type I, dont l'un des symptômes est la douleur idiopathique. Dans ces troubles, la douleur est causée par le relargage de certains neurotransmetteurs induit par les récepteurs CaV2.2 [482] qui sont régulés par CRMP2 [426]. Une diminution drastique de l'expression de CRMP2 dans l'hippocampe et de CRMP1 dans le néocortex temporal a été observée chez des patients épileptiques [483], [484]. Enfin, une dérégulation de l'expression de CRMP2 et CRMP4 est observée chez les patients atteints de maladies à prions, qui incluent la maladie de Creutzfeldt-Jakob [485], [486] tandis que l'expression de CRMP3 semble avoir un effet protecteur [434].

Expression des CRMPs dans les cancers

En plus de leurs rôles dans certaines maladies neurologiques, de plus en plus d'études mettent en évidence l'implication des CRMPs dans la migration et le développement tumoral. Là encore, les effets des CRMPs sur ces processus dépendent de différents facteurs : le type de cancer, le membre ou l'isoforme impliquée et l'état de phosphorylation.

CRMP1 inhibe la prolifération dans le médulloblastome [487] et est un gène suppresseur de tumeur dans le cancer gastrique [488], le cancer de la prostate [489] et le cancer du poumon [490] en réduisant la capacité d'invasion et la formation de métastases. Cependant, il a été montré que la forme longue de CRMP1, CRMP1-A qui a des effets antagonistes à CRMP1-B, est au contraire associée au mauvais pronostic et à une invasivité accrue dans le cancer du poumon [419], [418]. De même, la perte de CRMP1 promeut l'invasion des cellules de gliome mutées pour EGFRVIII [491].

Il a également été montré que CRMP2 phosphorylé permet la survie et la prolifération des cellules dans le glioblastome [492]. CRMP2 est sous-exprimé dans les tumeurs entéro-endocrine [493]. On observe également une diminution de l'expression de CRMP2 dans le cancer du sein mais celle-ci est corrélée à une augmentation de CRMP2 phosphorylé dans le noyau [494]. Dans le cancer du poumon, il y a également une corrélation entre la quantité de CRMP2 phosphorylé (notamment sur le S522) dans le noyau, surtout dans les cellules en division, et le mauvais pronostic [495], [496]. Dans le cancer du sein, le CRMP2 nucléaire est phosphorylé sur les résidus 509 et T514 et correspond à la forme longue CRMP2-A [496]. Enfin, il a été montré que CRMP2 est surexprimé dans le cancer colorectal [497] et il a été montré que CRMP2-A induit la migration et l'invasion en interagissant et inhibant ROCKII dans le cancer du côlon [440], [441].

CRMP4 est un frein à la migration cellulaire dans les cellules de neuroblastomes [498]. CRMP4 est un gène suppresseur de tumeur dans le cancer de la prostate [499]–[501] et le cancer gastrique [502], [503]. En revanche, l'expression de CRMP4 est corrélée au développement métastatique et au faible pronostic de survie dans le cancer pancréatique [504], [505]. Cependant, il a été montré que les deux isoformes de CRMP4, CRMP4-A et CRMP4-B, avaient des effets opposés dans le cancer gastrique [442]. En effet, CRMP4-A est sous-exprimé tandis que CRMP4-B est surexprimé dans les tumeurs comparé au tissu sain. CRMP4-A est un frein à la prolifération cellulaire, la migration et l'invasion contrairement à CRMP4-B. De plus la surexpression de CRMP4-A et l'extinction de CRMP4-B induit un arrêt en phases G1 et diminue le pourcentage de cellules en phase S.

CRMP5 est surexprimé dans le glioblastome et promeut la prolifération et la survie cellulaire [506]. Une forme de CRMP5 clivée en C-terminale a été identifiée dans le noyau des cellules de glioblastome et corrèle avec la prolifération cellulaire [507]. La surexpression de CRMP5 est corrélée à un haut grade de cancer neuroendocrine du poumon [508]. De plus, la surexpression de CRMP5 dans le cancer du poumon cause une réponse auto-immune de l'organisme qui aboutit à la production d'anticorps CRMP5 à l'origine de syndromes neurologiques paranéoplasiques [509]. Cette réponse auto-immune a également été observée dans le cancer du thymus et la cancer de la prostate [510],[511].

Bien que tous les autres membres soient associés au développement tumoral et métastatique de certains cancers, aucune étude n'a pour l'instant mis en évidence l'implication de CRMP3 dans ces processus.

Traitements ciblant CRMP2

L'implication de CRMP2 dans de nombreux troubles neurologiques fait de cette protéine une cible thérapeutique pour le développement de nouvelles thérapies. Le mode d'action des molécules utilisées repose sur différents mécanismes : modification de l'état de phosphorylation de CRMP2, modification de sa capacité d'interaction avec ses cibles, changement de sa conformation ou modification de son expression.

Le Naringenine (NAR) est une petite molécule dérivée d'extrait de rhizomes de *Drynaria* qui interagit spécifiquement avec CRMP2 et réduit sa phosphorylation. De plus l'interaction induit des modifications de la conformation de CRMP2 ce qui pourrait être à l'origine de l'impossibilité des kinases à

phosphoryler la protéine. Cette molécule devrait être utilisée comme traitement contre la maladie d'Alzheimer [512].

Le(R)-Lacosamide (R)-LCM est un médicament (Vimpat®) utilisé comme traitement anti-épileptique. Il a été montré que cette molécule interagit avec CRMP2 et bien que l'effet de cette interaction ne soit pas encore connu, il pourrait s'agir d'un des modes d'action de la molécule [513]. Le (S)-Lacosamide ((S)-LCM) est un stéréoisomère inactive du (R)-LCM Le (S)-LCM interagit également avec CRMP2 ce qui empêche sa phosphorylation par les kinases Cdk5 et GSK-3 β et diminue l'association de CRMP2 avec CaV2.2 réduisant ainsi l'influx de calcium. En revanche, Le (S)-LCM ne modifie pas la capacité d'interaction de CRMP2 avec les microtubules ni son oligomérisation [514]. Des études précliniques ont été réalisées pour traiter les migraines et les douleurs neuropathiques [515], [516]. Cette molécule pourrait également être utilisée pour traiter la neurofibromatose de type I [517] et comme traitement anti-cancéreux dans le glioblastome [492].

D'autres molécules ciblant l'inhibition de l'interaction CRMP2/CaV2.2 ont également été étudiées telles que : les peptides R9-CBD3-A6K et t-CNRP1 qui sont dérivés de CRMP2 [518], [519].

Certains traitements utilisés comme antidépresseurs tels que la Tianeptine, la Venlafaxine ou la Fluoxétine augmente l'expression de CRMP2 notamment dans l'hippocampe [520], [521]. De même, il a été montré que l'expression de CRMP2 était fortement modifiée après traitements anti-psychotiques pour soigner la schizophrénie [522].

La lanthionine ketimine ester (LKE) est un dérivé du métabolite lanthionine ketimine (LK) qui interagit avec CRMP2. Il a été montré que cette molécule altère la capacité d'interaction de CRMP2 avec ces protéines cibles mais augmente l'interaction de CRMP2 avec NF1 [523]. La LKE permet de réduire la neurodégénérescence et pourrait ainsi être utilisée comme traitement contre la sclérose [524].

Résultats

Objectif des travaux de recherche

Comme décrit précédemment, la surexpression de la phosphatase PRL-3 dans les tumeurs de mélanome uvéal est corrélée à un mauvais pronostic de survie des patients et au développement de métastases [170]. Le laboratoire a donc décidé d'investiguer le rôle de PRL-3 dans la tumorigenèse et le développement métastatique du mélanome uvéal. Pour cela, des lignées cellulaires stables de mélanome uvéal OCM-1 ont été établies : une lignée exprimant la phosphatase PRL-3 fusionnée à la GFP, une autre exprimant une forme mutante, catalytiquement inactive, de la phosphatase (C104S) fusionnée à la GFP et une exprimant la GFP seule. Les études fonctionnelles réalisées sur ces lignées ont montré que les cellules exprimant la forme sauvage de PRL-3 migrent plus vite et sont plus invasives que celles exprimant la forme mutante C104S ou la GFP seule [170] (Figure V.1).

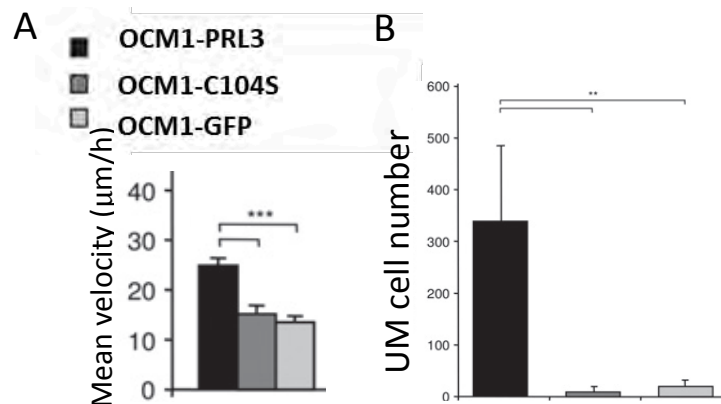


Figure V.1 : Implication de PRL-3 dans la migration et l'invasion des cellules de mélanome uvéal.

A Détermination de la vitesse de migration des cellules de mélanome uvéal. La surexpression de PRL-3 augmente la migration des cellules *in vitro* sur matrice de collagène I.

B La surexpression de PRL-3 augmente la capacité d'invasion des cellules de mélanome uvéal. Analyse quantitative de l'invasion des cellules OCM1. Les cellules sont déposées sur la membrane chorioallantoïde d'embryon de poulet. Après 8 jours, la présence de cellules humaines est détectée dans les fémurs par RT-qPCR.

Figure et légende d'après (Laurent et al., 2011).

Donc PRL-3 n'est pas seulement un facteur de mauvais pronostic mais la phosphatase à un rôle dans le processus métastatique du mélanome uvéal, comme cela a déjà été mis en évidence dans de nombreux cancers. L'objectif du laboratoire est d'identifier de nouvelles cibles de PRL-3 impliquées dans la migration et l'invasion du mélanome uvéal afin de mieux comprendre le mécanisme d'action de la phosphatase. Pour cela, une analyse phosphoprotéomique a été réalisée et celle-ci a permis d'identifier la protéine CRMP2. En effet, CRMP2 était différenciellement phosphorylé entre les cellules exprimant PRL-3 et celles exprimant le mutant C104S. Un des objectifs de ma thèse a donc été d'étudier le rôle de CRMP2, sous l'action de PRL-3 dans la migration et l'invasion du mélanome uvéal.

Partie I : Rôle de la phosphatase PRL-3/PTP4A3 et de CRMP2 dans la migration et l'invasion du mélanome uvéal

Publication soumise à Scientific Reports

Protein Tyrosine Phosphatase 4A3 (PTP4A3 / PRL-3) promotes Human Uveal Melanoma aggressiveness through dephosphorylation of CRMP2.

Laura DUCIEL*, Océane ANEZO *, Kalpana MANDAL, Cécile LAURENT, Nathalie PLANQUE, Frédéric COQUELLE, Jean-Baptiste MANNEVILLE, Simon SAULE.

Résumé :

Le mélanome uvéal est une tumeur agressive avec jusqu'à 50% des patients qui développent des métastases hépatiques. L'expression de la phosphatase PRL-3 est corrélée au mauvais pronostic de survie des patients et au développement métastatique. De plus, PRL-3 augmente la migration *in vitro* et l'invasion *in vivo* des cellules de mélanome uvéal. Nous avons identifié la protéine CRMP2 comme cible potentielle de PRL-3 car celle-ci est différenciellement phosphorylée dans les cellules exprimant la phosphatase. Nous montrons que l'inhibition de l'expression de CRMP2 dans les cellules de mélanome uvéal exprimant PRL-3 augmente la capacité de migration et d'invasion des cellules ce qui résulte à des modifications du réseau d'actine avec une diminution des fibres de stress, tandis que dans les cellules exprimant la forme mutante C104S, l'inhibition de CRMP2 n'a pas d'effet sur ces processus. De plus, l'étude des propriétés micro-rhéologiques des cellules (élasticité, viscosité et dureté du cytoplasme) montre que ces trois paramètres sont augmentés par l'expression de PRL-3 et/ou l'extinction de CRMP2. L'extinction de CRMP2 ayant des effets significatifs sur la micro-rhéologie des cellules uniquement en absence de PRL-3, ces résultats suggèrent que l'extinction de CRMP2 est équivalente à sa déphosphorylation par PRL-3 en ce qui concerne les propriétés micro-rhéologiques. L'ensemble de ces données suggère que PRL-3 agit en amont de CRMP2 dans le mélanome uvéal pour promouvoir la migration et l'invasion cellulaire. De plus, l'expression de CRMP2 dans les tumeurs de patients est prédictive de leur survie.

Title:

Protein tyrosine phosphatase 4A3 (PTP4A3/PRL-3) promotes the aggressiveness of human uveal melanoma through dephosphorylation of CRMP2.

Authors and affiliations:

Laura DUCIEL^{*1,2}, Océane ANEZO^{*1,2}, Kalpana MANDAL³, Cécile LAURENT⁴, Nathalie PLANQUE^{1,5}, Frédéric M. COQUELLE^{1,2}, Jean-Baptiste MANNEVILLE⁶, and Simon SAULE^{1,2}.

1. Institut Curie, PSL Research University, CNRS, INSERM, Orsay, France. 2. Université Paris Sud, Université Paris-Saclay, CNRS, INSERM, Orsay, France. 3. Institute for Medicine and Engineering, University of Pennsylvania, Philadelphia-19104, USA. 4. CALYM LYSARC Institut Carnot, Paris, France. 5. Université Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, France. 6. Institut Curie, Paris Sciences and Letters Research University, CNRS, Paris, France.

*These authors have contributed equally to this work

Corresponding author:

Simon SAULE

Institut Curie, Section Recherche

UMR3347/U1021

Campus Universitaire d'Orsay Bâtiment 110

91405 Orsay Cedex

Tél : 00 33 (1) 69 86 71 53, Fax : 00 33 (1) 69 86 30 51

Running title:

PTP4A3 acts upstream of CRMP2 during uveal melanoma cell dissemination.

Financial support:

This work was supported by grants from Retina France, the PIC Uveal Melanoma from the Curie Institute. K.M. and J-B.M. were funded by the Plan Cancer 2012-2014 INSERM-Tecsan (grant number PC201125) and by a grant from the Labex CeTisPhyBio.

ABSTRACT

Uveal melanoma (UM) is an aggressive tumor in which approximately 50% of patients develop metastasis. Expression of the PTP4A3 gene, encoding a phosphatase, is predictive of poor patient survival. PTP4A3 expression in UM cells increases their migration *in vitro* and invasiveness *in vivo*. Here, we show that CRMP2 is mostly dephosphorylated on T514 in PTP4A3 expressing cells. We also demonstrate that inhibition of CRMP2 expression in UM cells expressing PTP4A3 increases their migration *in vitro* and invasiveness *in vivo*. This phenotype is accompanied by modifications of the actin microfilament network, with shortened filaments, whereas cells with a inactive mutant of the phosphatase do not show the same behavior. In addition, we showed that the cell cytoplasm becomes stiffer when CRMP2 is downregulated or PTP4A3 is expressed. Our results suggest that PTP4A3 acts upstream of CRMP2 in UM cells to enhance their migration and invasiveness and that a low level of CRMP2 in tumors is predictive of poor patient survival.

Keywords:

PTP4A3/PRL-3, migration, invasiveness, metastasis, CRMP2, Uveal Melanoma.

INTRODUCTION

Uveal melanoma (UM) is the most common intraocular tumor in adults. This tumor is very aggressive and up to 50% of patients subsequently develop distant metastasis, predominantly in the liver¹⁻³. Most patients survive less than 12 months after metastasis occurrence and currently there is no effective treatment to cure metastatic UM, or to improve the overall survival⁴. The genome-wide analysis and gene expression profiling (GEP) have allowed the identification of two major categories of UM, characterized by a low (class1) or a high (class2) metastatic potential⁵. A recent study based on a comprehensive multiplatform analysis of 80 UMs subdivided these two categories into four subgroups with different genomic alterations, transcriptional features, somatic copy number, and DNA methylation profiles⁶.

We previously showed that the strong expression of protein tyrosine phosphatase 4A3/protein of regenerating liver-3 (PTP4A3/PRL-3) is predictive of metastasis using a transcriptomic approach⁷. Moreover, we showed that PTP4A3 expression in UM cells increases their migration *in vitro* and invasiveness *in vivo*⁷. PTP4A3 is overexpressed in many types of cancers, including gastric cancers⁸, ovarian cancers⁹, non-small cell lung cancer¹⁰, human gliomas¹¹, nasopharyngeal carcinoma¹², metastatic colorectal carcinomas (CRCs), breast cancer, and cervical cancer¹³. In addition, PTP4A3 is not only a marker of poor prognosis, but is also involved in oncogenesis and is a key metastatic event¹⁴. We previously showed that PTP4A3 promotes aggressiveness through membrane accumulation of matrix metalloproteinase 14 (MMP14)¹⁵. Indeed, MMP14 belongs to the transmembrane metalloproteases (MMPs), a class of molecules that are responsible for the degradation and turnover of the extracellular matrix (ECM), an event that is required for cell migration and invasiveness. Among PTP4A3 substrates there are currently three cytoskeletal proteins that have been identified as PTP4A3 targets, providing strong evidence of PTP4A3 role promoting migration and invasion by cytoskeleton remodeling¹⁶⁻¹⁸.

Here, we have identified CRMP2 as a new target of PTP4A3 by 2D phosphoprotein analysis. These two proteins interact in co-immunoprecipitation assays. We found that CRMP2 is less phosphorylated on T514 after interaction with PTP4A3 in comparison to the catalytically inactive mutant of the phosphatase, PTP4A3 (C104S).

CRMP2 is a cytosolic phosphoprotein that interacts with numerous binding partners to affect microtubule dynamics, protein endocytosis, and vesicle recycling¹⁹. CRMP2 acts largely by stabilizing polymerized tubulin at the plus end of microtubules²⁰. Several distinct signaling pathways regulate CRMP2 phosphorylation on different amino acids, to change CRMP2-protein binding interactions. Modifications of the phosphorylation state of CRMP2 change its activity. Indeed, phosphorylated CRMP2 loses its affinity for microtubule heterodimers, thus reduces microtubule stability. In addition to tubulin, CRMP2 binds to the cytoskeletal proteins actin and vimentin¹⁹.

In the present study, we demonstrate that PTP4A3 expression or CRMP2 downregulation affect microrheological properties by increasing the stiffness of UM cells. This suggests that CRMP2 downregulation has an effect similar to that of CRMP2 dephosphorylation. We showed that CRMP2 loss in UM cells overexpressing PTP4A3, affects the organization of the actin network, increased MMP14 accumulation at the cell membrane, increases the migration *in vitro* and invasiveness *in vivo*. CRMP2 is downregulated in PTP4A3 expressing UM tumors.

RESULTS

PTP4A3 expression reduces phosphorylation of CRMP2 on T514

We previously showed that stable PTP4A3 expression promotes invasion of OCM-1 UM cells⁷. Here, we identified phosphoproteins regulated by PTP4A3 by performing 2D phosphoprotein gel analysis between OCM-1 cells expressing wildtype PTP4A3 and those expressing the phosphatase inactive C104S mutant of PTP4A3, devoid of a pro-invasive

effect⁷. This was followed by mass-spectroscopy of the differential spots, which identified CRMP2 among other proteins. CRMP2 is a phosphoprotein that generates more than seven spots in 2D gel electrophoresis²¹. Figure 1A shows the profile of CRMP2 spots by 2D electrophoresis of OCM-1 cells expressing EGFP-PTP4A3 or EGFP-C104S using anti-CRMP2, anti-CRMP2 S522, and anti-CRMP2 T514 antibodies. The densitometric profiles of CRMP2 (Fig. 1B) show that the number of CRMP2 phosphorylated spots were reduced in the presence of wildtype PTP4A3, especially those of T514, whereas there is more total phosphorylated CRMP2 in these cells (Fig. 1C), possibly due to the overexpression of SRC kinases in PTP4A3-overexpressing cells²².

PTP4A3 and CRMP2 interact

PTP4A3 and CRMP2 would be expected to interact if CRMP2 is a target of PTP4A3. Thus, we carried out co-immunoprecipitation assays using the GFP-Trap[®] kit. Cell lysates were prepared from OCM-1 cells expressing EGFP-PTP4A3, EGFP-C104S, or EGFP, and GFP-Trap[®] beads were used for immunoprecipitation. The input and precipitated proteins were then separated by SDS-PAGE and analyzed by Western blotting (Fig. 2A). CRMP2 was detected only in cells expressing either EGFP-PTP4A3 or the mutant EGFP-C104S after co-immunoprecipitation. Much less CRMP2 was recovered from cells expressing wildtype PTP4A3 than that expressing the C104S mutant, yet the mutated phosphatase was designed to increase the retention time with interacting partners, suggesting that the interaction between CRMP2 and the phosphatase is direct.

To study whether the dephosphorylation of CRMP2 mediated by PTP4A3 is direct we performed a GST pull down experiment with GST-PTP4A3 and GST-C104S fusion proteins. Determination of the phosphatase activity of GST-PTP4A3 and GST-C104S, tested *in vitro* using the OMFP substrate (Fig. 2B), showed that GST-PTP4A3 can dephosphorylate the OMFP substrate, leading to higher absorbance at 450 nm than for GST-C104S. CRMP2 was immunoprecipitated from OCM-1 cell lysates, eluted in three successive fractions, and the

presence of phosphorylated T514 CRMP2 analyzed by Western blotting (Fig. 2C). Fractions F2 and F3, containing phosphorylated T514 CRMP2, were used for subsequent pull downs.

Fusion proteins and phosphorylated CRMP2 were mixed with glutathione-Sepharose beads. After incubation and pull down, a Western blot was performed with anti-CRMP2 and anti-CRMP2 (T514) antibodies and the ratio of the detected proteins determined. CRMP2 incubated with active phosphatase exhibited a reduced amount of phosphorylated T514 (Fig. 2D and 2E), favoring the hypothesis of CRMP2 as a direct target of PTP4A3.

CRMP2 downstream of PTP4A3 reduces cell migration and invasiveness

To determine whether the function of CRMP2 is required for the PTP4A3-associated promigratory and invasive phenotypes of UM cells, we performed RNA interference experiments by lentivirus shRNA anti-CRMP2 infection (Fig. 3A). Random cell migration on collagen I and invasiveness by the CAM (Chorioallantoic membrane) *in vivo* dissemination assay were tested. The downregulation of CRMP2 expression significantly increased the migration speed of EGFP-PTP4A3 expressing cells, whereas the migration speed of the control cells expressing EGFP-C104S or EGFP was not affected (Fig. 3B). We performed the same knock-down experiment on human PDX-MP41 cells (Fig. 3C & 3D), which exhibit a low metastatic genetic profile²³ and a moderate level of endogenous PTP4A3 expression (Fig. 3C). The migration speed of PDX-MP41 cells increased significantly after CRMP2 knock-down (Fig. 3D). In addition, downregulation of CRMP2 expression increased PTP4A3-associated invasiveness *in vivo* (Fig. 3E). These findings suggest that CRMP2 antagonizes PTP4A3-associated migration *in vitro* and *in vivo* invasiveness of UM cells.

CRMP2 affects MMP14 membrane accumulation

CRMP2 may affect cell migration and invasiveness due to its role in vesicular trafficking¹⁹. PTP4A3 increased MMP14 at the cell surface¹⁵, therefore, we quantified endogenous

MMP14 membrane localization in nonpermeabilized OCM-1 cells by flow cytometry. The expression of PTP4A3 increased the quantity of MMP14 localized at the cell surface, as observed previously. Furthermore, the downregulation of CRMP2 expression in EGFP-PTP4A3 expressing cells significantly increased the membrane level of MMP14 relative to that of the shRNA control (Fig. 3F), suggesting that CRMP2 may be involved in MMP14 vesicular transport by negatively regulating its accumulation at the cell surface. Thus, the role of CRMP2 in the migration and invasion of UM cells may be explained, in part, by the control of MMP14 levels at the membrane.

CRMP2 affects cytoskeleton

Although CRMP2 is known to bind to actin, little is known about its role in the regulation of the actin network. Therefore, we analyzed modifications of the actin network following CRMP2 knock-down in OCM-1 cells expressing EGFP-PTP4A3, EGFP-C104S, or EGFP. The actin network in the cells was visualized by phalloïdin staining (Fig. 4A) and the number of short actin fragments quantified and normalized by the cell area (Fig. 4B). All cells showed a similar actin network, with the presence of numerous stress fibers, except those expressing PTP4A3 in which CRMP2 expression was knocked down. Indeed, there was a significant reduction in the number of actin stress fibers in these cells and thus an increase in the number of short actin fragments in these cells (Fig. 4B). This observation may be surprising, given that stress fibers are often described as contractile bundles necessary for cell migration. Yet, here the strong reduction in the number of stress fibers correlates with increased cellular migration. However, several studies have shown that stress fibers are more prominent in stationary cells²⁴ and that these structures are ill-suited for cellular motility.

As ROCKII is involved in stress-fiber formation, we assessed the actin network in OCM-1 cells treated with a ROCKII inhibitor (Y27632) to confirm our results. Cells treated with Y26732 had much fewer stress fibers compare to non-treated cells (Fig. 4C and D),

confirming the role of ROCKII in stress-fiber formation. We then analyzed the migratory capacity of these cells. Cells treated with Y27632 migrated faster in comparison to non-treated cells, independently of CRMP2 expression (Fig. 4E), which confirms that the increase cellular migration is associated with less stress fibers in OCM-1 cells. As Cofilin phosphorylation is regulated by ROCKII *via* LIMK, we also confirmed the dephosphorylation of Cofilin S9 in Y27632-treated cells by Western blotting (supplementary Fig. 1).

The role of CRMP2 on microtubule dynamics is well characterized in neurons¹⁹. We also analysed the effect of CRMP2 knock-down on microtubule dynamics in OCM-1 cells expressing EGFP-PTP4A3 or EGFP (supplementary Fig. 2). Cells were treated with nocodazole, a microtubule depolymerizing agent, washed, and then fixed at different time. We performed a tubulin immunofluorescence on fixed cells in order to follow microtubule repolymerization. The results show that 5 minutes after nocodazole treatment, PTP4A3 shCRMP2 expressing cells have shorter microtubules compare to the other cells (supplementary Fig. 2B) which suggest a delay in microtubule repolymerization. This result is correlated with a decrease of the percentage of cells with an aster (supplementary Fig. 2C). Thus, CRMP2 regulated microtubule polymerization in UM cells as it was known in neurons. Interestingly, the effect of CRMP2 knock-down on microtubules are PTP4A3 dependant in these cells.

CRMP2 affects the microrheological properties of cells

The cytoskeleton maintains cell architecture, generates force and contractility, and plays an active role in many cellular processes, such as cell division and cell migration. Actin filaments and microtubules have been shown to contribute to intracellular mechanics²⁵ and CRMP2 participates in regulating the cellular architecture through its interaction with cytoskeletal proteins. We thus performed microrheology experiments (Fig. 5A) to determine the viscoelastic properties of the cell cytoplasm. Viscoelastic relaxation experiments showed that the rigidity of OCM-1 C104S cells increased after CRMP2 knock down to a level already

obtained in OCM-1 PTP4A3 cells in the presence of CRMP2 (Fig. 5B). Quantification of the relaxation curves using a phenomenological model-independent approach showed a significant increase in the rigidity index and bead-step amplitude in OCM-1 C104S cells upon CRMP2 knock-down (Fig. 5C, upper panels). In contrast, the knock-down of CRMP2 in OCM-1 PTP4A3 cells did not modify intracellular rigidity, suggesting that knocking down CRMP2 was equivalent to dephosphorylation of the protein by PTP4A3 for this property. Consistent with these results, analysis of the relaxation curves using the Standard Liquid Linear (SLL) viscoelastic model showed that knocking down CRMP2 induced a significant increase in both elasticity and viscosity in OCM-1 C104S cells, but only a slight increase in elasticity in OCM-1 PTP4A3 cells (Fig. 5C, lower panels).

Effect of CRMP2 expression on the survival of patients with uveal melanoma

CRMP2 mRNA expression in patient tumors inversely correlated with PTP4A3 mRNA expression (Spearman coefficient of -0,4) and Kaplan-Meier metastasis-free plots using CRMP2 as a binary variable showed that CRMP2 levels below the median were associated with reduced metastasis-free survival ($P = 0.054$) (Fig. 6A and 6B).

DISCUSSION

UM cells that overexpress PTP4A3 migrate faster *in vitro* and are more invasive *in vivo* compare to cells expressing the catalytically inactive mutant PTP4A3(C104S), implicating the phosphatase activity of PTP4A3 in the metastatic process.

Here, we identified CRMP2 as a new target of PTP4A3 by 2D phosphoprotein analysis (Fig. 1). Indeed, CRMP2 was less highly phosphorylated, especially on T514 (Fig. 2E). However, purification of the phosphoproteins showed phosphorylated CRMP2 to be more abundant in cells expressing PTP4A3 compare to those expressing the mutant (C104S). This contra-

intuitive observation may be surprising, but a phosphoproteomic study showed that PTP4A3-expressing cells show a pronounced increase in protein tyrosine phosphorylation, especially due to Src activation²². Thus, it is possible that PTP4A3 expression increases global CRMP2 phosphorylation, and more particularly those of tyrosine (CRMP2 has at least six tyrosine phosphorylation sites: Y32, Y251, Y275, Y431, Y479, and Y499)²⁶ while locally decreasing CRMP2 phosphorylation of T514. Our results also suggest that there is a physical interaction between CRMP2 and PTP4A3 and that this interaction leads to decreased CRMP2 phosphorylation on T514, suggesting that CRMP2 is a direct target of PTP4A3. Moreover, the greater recovery of CRMP2 from cells carrying the C104S mutant than those carrying wildtype PTP4A3 in GFP-trap experiment suggests a higher retention time of the mutated phosphatase, reinforcing this possibility. Glycogen synthase kinase-3 β (GSK-3 β) phosphorylates CRMP2 at T514 and controls axon/dendrite fate by promoting neurite elongation via microtubule assembly²⁷. The phosphorylation of CRMP2 T514 by GSK-3 β inhibits CRMP2 activity, leading to microtubule depolymerization and destabilization. The role of microtubules in cell migration is well known and the microtubule depolymerizing drug colcemid²⁸ reduces cell migration. Another study also showed that microtubule depolymerization interferes with cell motility²⁹.

Our study strongly suggests that CRMP2 acts to brake the migration and invasion process of UM cells (Fig. 3). However, the increase in the speed of cells in which CRMP2 was knocked down was only observed in those expressing PTP4A3. CRMP2 knockdown did not change the speed of migration of cells expressing the mutant (C104S) or GFP alone. Along this line, CRMP2 knockdown was shown to decrease the duration of closure in a scratch wound assay based on PDGF-induced cell migration³⁰. Thus, the presence of PTP4A3 is necessary to reveal the loss of the effect of CRMP2. Our previous studies showed that PTP4A3 regulates integrin β 1 in adhesion structures during the migration of UM cells³¹ and promotes aggressiveness through membrane accumulation of MMP14¹⁵. Thus, PTP4A3 appears to

have a large spectrum of action, with many targets, that drives cell invasiveness. Here we show that CRMP2 also affect MMP14 membrane accumulation and given the role of CRMP2 in vesicular trafficking, we can hypothesis that PTP4A3 drives MMP14 membrane accumulation, and therefore invasion, in part by regulating CRMP2. MMP14 membrane accumulation is also observed in cells expressing the mutant C104S, but the level reached in these cells is not sufficient to increase cell migration. Another major player involved in the oncogenesis of UM *via* vesicular trafficking is the small GTPase ARF6. ARF6 activates multiple pathways, including PLC/PKC, Rho/Rac, and YAP³². ARF6 has also been shown to regulate the exocytosis of MMP14 in breast cancer invasion³³ and PTP4A3 and ARF6 have been shown to interact in co-immunoprecipitation assays³⁴. Thus, the coordination of all these players in UM metastasis needs to be investigated.

Another mechanism that can explain the role of CRMP2 in migration and invasion is cytoskeleton remodeling. Indeed, we also show that more rapidly migrating OCM-1 cells contain fewer stress fibers (Fig. 4). This observation was confirmed by the increase of migration capacity of cells treated with the ROCKII inhibitor, Y27632. However, the increase in the migration speed of ROCKII-inhibited cells was not dependent on CRMP2.

The experiments on the microrheological properties of the cells show that knocking down CRMP2 is equivalent to the effect of PTP4A3 on the protein in controlling intracellular rigidity (Fig. 5). The lower rigidity of the cytoplasm of C104S cells is consistent with the reported microtubule destabilization in these cells. However, these microrheological modifications do not explain the migration/invasion phenotype, as knocking down CRMP2 in C104S cells changed the elastic properties of the cells but had no effect on the motility properties, suggesting additional key properties of PTP4A3 in UM invasion. The Figure 7 shows a proposed model of CRMP2 regulation by PTP4A3 in uveal melanoma cells. This model suggests that the phosphatase PTP4A3 dephosphorylates CRMP2 on the T514 affecting microtubule function and actin fibers formation. These modifications on cytoskeleton will

affect cells micro-rheological properties and MMP14 membrane accumulation leading to an increase of both migration and invasion.

The level of CRMP2 expression is a good prognostic factor for UM patients and is predictive of metastasis formation. The role of CRMP2 in cancer has not been extensively studied, but several studies have been performed on the use of CRMP2 as a prognostic marker. A study carried out in breast cancer showed a lower level of CRMP2 in cancer cells than in healthy tissue, whereas there is greater phosphorylation of CRMP2 at T509, S518, and S522³⁵. In contrast, some studies have shown the opposite, with a higher CRMP2 level associated with tumoral progression^{36,37}. Thus, the role of CRMP2 on tumor development appears to vary depending on the cell type.

Finally, many clinical trials are currently testing drugs that inhibit CRMP2 phosphorylation, as CRMP2 is involved in various neurological disorders (Alzheimer's disease, schizophrenia, migraine, etc.)¹⁹. This is notably the case of (S)-Lacosamide, used in preclinical models of cephalic pain³⁸. However, our results, suggesting increased invasion after CRMP2 dephosphorylation, should encourage additional studies to verify the safety of CRMP2 dephosphorylation, especially concerning the metastasis development in UM.

MATERIALS AND METHODS

Cell culture and shRNA

We previously established OCM-1 clones stably expressing EGFP-PTP4A3, EGFP-C104S, or EGFP⁷. Human PDX-MP41 cells bearing the GNA11 mutation and wild-type BAP1, disomic for chromosome 3²³ were maintained in RPMI (Gibco) with 20% FBS (HyClone UK laboratories). CRMP2 shRNA lentiviral particles were purchased from Santa Cruz Biotechnology (sc-44485-V). Cells were transduced with three specific lentiviral constructs targeting CRMP2 or control non-target shRNA (sc-108080). UM cells expressing shRNA were selected with puromycin.

Antibodies and constructs

Rabbit polyclonal anti-CRMP2 (CP2161) and rabbit polyclonal anti-CRMP2 (S522) (CP2191) antibodies were purchased from ECM Biosciences. Rabbit polyclonal anti-CRMP2 (T514) (ab62478), mouse monoclonal anti- β -actin (A5441), and mouse monoclonal anti- α -tubulin (T9026) antibodies were purchased from Sigma. Mouse monoclonal anti-PTP4A3 (sc-130355) was purchased from Santa Cruz Biotechnology. Mouse monoclonal anti-GFP (11814460001) was purchased from Roche. Rabbit polyclonal anti-cofilin (3318) and Rabbit polyclonal anti-cofilin (S3) antibodies were purchased from Cell Signaling. The GST-tagged PTP4A3 and C104S were generated by PCR amplification and then ligated into the pGEX-4T-2 expression vector.

Phosphoprotein enrichment and two-dimensional (2D) gel electrophoresis

Phosphorylated proteins were purified from OCM-1 cells using the PhosphoProtein purification kit from Qiagen following the manufacturer's instructions. Total protein extract (2.5 mg) was loaded onto PhosphoProtein affinity purification columns and eluted fractions with high concentrations of phosphorylated proteins were pooled, concentrated, and processed using a 2D clean-up kit (GE Healthcare), following the manufacturer's protocol. Phosphorylated proteins were separated on their isoelectric point. Cleaned samples (200 μ g) were incubated with IPG (immobilized pH gradient) strips, containing a linear 4-7 pH gradient (BIO-RAD), at room temperature for 16 h and isoelectric focusing performed at 50 μ A, until 15,000V/h was obtained, using a PROTEAN i12 IEF Cell at room temperature. For the second-dimension electrophoresis, the IPG strips were incubated for 10 min at room temperature in equilibration buffer (0.375 M Tris-HCl pH8.8, 6 M urea, 2% SDS, 4% glycerol) containing 130 mM DTT, and then for 10 min in equilibration buffer containing 135 mM

iodoacetamide. The IPG strips were then placed at the top of a second gel, followed by SDS-PAGE, and Western blotting performed.

GFP-trap

Cells were lysed in lysis buffer containing 10mM Tris-HCl pH 7.5, 150mM NaCl, 0.5 mM EDTA, 0.5% NP40, PhosSTOP (Sigma), and protease inhibitor cocktail (Sigma) and processed as previously published¹⁵.

Immunoprecipitation

Cell lysate : Cells were lysed in 50 mM Tris-HCL pH 8, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 2% NP40, PhosSTOP (Sigma), and protease inhibitor cocktail (Sigma).

Five milligrams of total protein extract was added to washed protein A sepharose and incubated 2 h at 4°C for pre-clearing. After centrifugation, the supernatant was collected to eliminate non-specific binding and incubated overnight at 4°C with anti-CRMP2 antibody at 1/200. Samples were incubated 4 h at 4°C with 200 μ l protein A Sepharose, previously washed using the same buffer as for the pre-clearing. After washing proteins were eluted with 0.1 M glycine pH 3 in three successive fractions. The presence of CRMP2 and its phosphorylation state (T514) were verified by Western blot.

GST fusion protein purification

Escherichia coli (BL21) were used to produce the GST fusion proteins. To induce production, 1 mM isopropyl- β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) was added to the culture 3 h prior to lysis. Bacteria were lysed by suspending in 50 mM Tris HCl, 250 mM NaCl, 2 mM DTT, 0.5 mM PMSF, and protease inhibitor cocktail (Sigma) and then were sonicated. The GST fusion proteins were purified from bacterial lysates with glutathione Sepharose 4B beads (Glutathione Sepharose 4B GST-tagged protein purification resin, GE Healthcare) in the lysis buffer overnight at 4°C.

Phosphatase activity test

A fraction of the GST fusion proteins was used to perform an *in vitro* phosphatase activity test. GST fusion proteins were washed in 50 mM Tris HCl pH 8, 140 mM NaCl, 2.7 mM KCl and 2 mM DTT. 3-O-Methylfluorescein phosphate (OMPF) substrate was added to the GST fusion proteins to a final concentration of 1 mM and samples were incubated 30 min at 37°C in the dark. The absorbance at 450 nm was measured.

GST pull-down

Fractions containing phosphorylated CRMP2 were pooled and added to the GST fusion proteins in 50 mM tris-HCl pH 8, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.4% NP40, 2 mM DTT, and protease inhibitor cocktail (Sigma). Samples were incubated at 4°C overnight and washed five times. The presence of CRMP2 and its phosphorylation state (T514) were verified by Western blot.

Two-Dimensional (2D) random cell migration assayed by time-lapse video microscopy

Cells were seeded on a 50 $\mu\text{m}/\text{mL}$ collagen I (BD Corning) matrix and migration was monitored by time-lapse video microscopy every 4 min for 12 h at 37°C, as described in ⁷.

Flow Cytometry

Cells were seeded on a collagen I matrix, incubated for 24 h, serum starved for an additional 24 h, and dissociated using a non-enzymatic dissociation solution (Sigma-Aldrich). The amount of MMP14 on the cell surface was assessed as previously published ¹⁵.

Drug treatment

The inhibition of ROCKII in OCM-1 cells was achieved by Y27632 (Sigma-Aldrich) treatment at 10 μM for 24 h at 37°C.

Immunofluorescence

OCM-1 cells were seeded 24h on glass-coverslips coated with 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ collagen I. Cells were rinsed with PHEM buffer and fixed with 4% PFA/0.02% glutaraldehyde in PHEM (Pipes 120 mM, Hepes 50 mM, EGTA 20 mM, AcMg 4 mM in H_2O) at 37°C for 12 min. Cells were permeabilized in 0.5% Triton X-100 in PBS, blocked in 1% BSA, and then labeled with Acti-stain 555 phalloïdin (PHDH1, Cytoskeleton) at a dilution of 1/200 for 30 min at 37°C. Cell nuclei were stained with DAPI and coverslips were mounted in 50% Glycerol/100 mg/mL DABCO (Sigma-Aldrich) in PBS. Images were acquired with Metamorph software using a 63X or 40X oil immersion objective of a wide-field microscope (DM RXA, Leica), equipped with a charge-coupled device camera (CoolSNAP HQ, Photometrics) and a piezoelectric translator at the base of the objective. Stacks of images were taken in the z axis with an interval of 0.2 nm for deconvolution. Deconvoluted images were processed using ImageJ.

Quantification: we performed a maximum intensity z projection of whole stacks. Objects with a size between 0 and 40 adjoining pixels were counted using segmentation by thresholding and granulometry functions of ImageJ and counts were then normalized to cell area.

Chorioallantoid membrane (CAM) assay

We used 0.25×10^6 cells to inoculate the CAM of fertilized chick eggs (EARL Morizeau, Dangers, France) as previously published¹⁵.

Microrheology

Active microrheology, based on optical tweezers and fast confocal microscopy, was described previously³⁹. Briefly, 2- μm diameter fluorescent microspheres (Thermo Fisher Scientific) were internalized in cells overnight. The culture medium was supplemented with 20 mM Hepes before the experiment, which was performed on a Nikon A1R confocal microscope equipped with a 37° incubator, a nanometric piezostage (Mad City Labs), and a home-made single fixed optical trap (1060-1100 nm, 2 W maximal output power, IPG

Photonics). A bead was trapped by the optical tweezers (laser output power 1 W, corresponding to 150 mW for the sample). Following a 0.5- μm step displacement of the stage applied by the piezostage, the bead relaxation $x_b(t)$ towards the optical trap center was measured by single particle tracking. First, a model-independent phenomenological parameter, the rigidity index (RI), was calculated as the normalized area under the relaxation curve. RI values fall between 0 (very soft cytoplasm) and 1 (very stiff cytoplasm). The bead step displacement was defined as the initial displacement of the bead following the 0.5 μm step displacement of the stage. The values of the bead step displacement fall between 0 μm (very soft cytoplasm) and 0.5 μm (very stiff cytoplasm). Second, the Standard Linear Liquid (SLL) model^{40,41} was used to fit the relaxation curves. The SLL model consists of a Kelvin-Voigt body (a spring of elasticity μ and a dashpot of viscosity η in parallel) and a dashpot in series. A custom-written Matlab code was used to fit the relaxation curves with the SLL model yielding the elasticity (in pN/ μm) and viscosity (in Pa.s) of the bead microenvironment.

Statistical analysis

Data are presented as the means \pm SD for each condition except when indicated. Statistical analyses were performed using StatView software (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). The Mann Whitney-Wilcoxon test or Student's t-test, when indicated, were used for comparisons.

BIBLIOGRAPHIC REFERENCES

1. Collaborative Ocular Melanoma Study Group. Assessment of metastatic disease status at death in 435 patients with large choroidal melanoma in the Collaborative Ocular Melanoma Study (COMS): COMS report no. 15. *Arch. Ophthalmol. (Chicago, Ill. 1960)* **119**, 670–6 (2001).
2. Singh, A. D. & Topham, A. Incidence of uveal melanoma in the United States: 1973-1997. *Ophthalmology* **110**, 956–61 (2003).
3. Singh, A. D. & Topham, A. Survival rates with uveal melanoma in the United States:

- 1973-1997. *Ophthalmology* **110**, 962–5 (2003).
4. Chattopadhyay, C. *et al.* Uveal melanoma: From diagnosis to treatment and the science in between. *Cancer* **122**, 2299–312 (2016).
 5. Onken, M. D., Worley, L. A., Tuscan, M. D. & Harbour, J. W. An accurate, clinically feasible multi-gene expression assay for predicting metastasis in uveal melanoma. *J. Mol. Diagn.* **12**, 461–8 (2010).
 6. Robertson, A. G. *et al.* Integrative Analysis Identifies Four Molecular and Clinical Subsets in Uveal Melanoma. *Cancer Cell* **32**, 204–220.e15 (2017).
 7. Laurent, C. *et al.* High PTP4A3 phosphatase expression correlates with metastatic risk in uveal melanoma patients. *Cancer Res.* **71**, 666–74 (2011).
 8. Miskad, U. A. *et al.* High PRL-3 expression in human gastric cancer is a marker of metastasis and grades of malignancies: an in situ hybridization study. *Virchows Arch.* **450**, 303–310 (2007).
 9. Polato, F. *et al.* PRL-3 phosphatase is implicated in ovarian cancer growth. *Clin. Cancer Res.* **11**, 6835–9 (2005).
 10. Yamashita, S. *et al.* Down-regulation of the human PRL-3 gene is associated with the metastasis of primary non-small cell lung cancer. *Ann. Thorac. Cardiovasc. Surg.* **13**, 236–9 (2007).
 11. Kong, L., Li, Q., Wang, L., Liu, Z. & Sun, T. The value and correlation between PRL-3 expression and matrix metalloproteinase activity and expression in human gliomas. *Neuropathology* **27**, 516–521 (2007).
 12. Zhou, J., Wang, S., Lu, J., Li, J. & Ding, Y. Over-expression of phosphatase of regenerating liver-3 correlates with tumor progression and poor prognosis in

- nasopharyngeal carcinoma. *Int. J. Cancer* **124**, 1879–1886 (2009).
13. Bessette, D. C., Qiu, D. & Pallen, C. J. PRL PTPs: mediators and markers of cancer progression. *Cancer Metastasis Rev.* **27**, 231–252 (2008).
 14. Al-Aidaros, A. Q. O. & Zeng, Q. PRL-3 phosphatase and cancer metastasis. *J. Cell. Biochem.* **111**, 1087–98 (2010).
 15. Maacha, S. *et al.* Protein Tyrosine Phosphatase 4A3 (PTP4A3) Promotes Human Uveal Melanoma Aggressiveness Through Membrane Accumulation of Matrix Metalloproteinase 14 (MMP14). *Investig. Ophthalmology Vis. Sci.* **57**, 1982 (2016).
 16. Mizuuchi, E., Semba, S., Kodama, Y. & Yokozaki, H. Down-modulation of keratin 8 phosphorylation levels by PRL-3 contributes to colorectal carcinoma progression. *Int. J. Cancer* **124**, 1802–10 (2009).
 17. Forte, E. *et al.* Ezrin is a specific and direct target of protein tyrosine phosphatase PRL-3. *Biochim. Biophys. Acta* **1783**, 334–44 (2008).
 18. Zheng, P. *et al.* Stathmin, a new target of PRL-3 identified by proteomic methods, plays a key role in progression and metastasis of colorectal cancer. *J. Proteome Res.* **9**, 4897–905 (2010).
 19. Khanna, R. *et al.* Opening Pandora's jar: a primer on the putative roles of CRMP2 in a panoply of neurodegenerative, sensory and motor neuron, and central disorders. *Future Neurol.* **7**, 749–771 (2012).
 20. Fukata, Y. *et al.* CRMP-2 binds to tubulin heterodimers to promote microtubule assembly. *Nat. Cell Biol.* **4**, 583–591 (2002).
 21. Patrakitkomjorn, S. *et al.* Neurofibromatosis type 1 (NF1) tumor suppressor, neurofibromin, regulates the neuronal differentiation of PC12 cells via its associating

- protein, CRMP-2. *J. Biol. Chem.* **283**, 9399–413 (2008).
22. Walls, C. D. *et al.* Phosphatase of Regenerating Liver 3 (PRL3) Provokes a Tyrosine Phosphoproteome to Drive Prometastatic Signal Transduction. *Mol. Cell. Proteomics* **12**, 3759–3777 (2013).
 23. Laurent, C. *et al.* Patient-derived xenografts recapitulate molecular features of human uveal melanomas. *Mol. Oncol.* **7**, 625–36 (2013).
 24. Pellegrin, S., Mellor, H., Barry, P., Andrews, P. & Jester, J. V. Actin stress fibres. *J. Cell Sci.* **120**, 3491–9 (2007).
 25. Mandal, K., Asnacios, A., Goud, B. & Manneville, J.-B. Mapping intracellular mechanics on micropatterned substrates. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **113**, E7159–E7168 (2016).
 26. Zheng, Y. *et al.* Tuning microtubule dynamics to enhance cancer therapy by modulating FER-mediated CRMP2 phosphorylation. *Nat. Commun.* **9**, 476 (2018).
 27. Yoshimura, T. *et al.* GSK-3 β regulates phosphorylation of CRMP-2 and neuronal polarity. *Cell* **120**, 137–49 (2005).
 28. Vasiliev, J. M. *et al.* Effect of colcemid on the locomotory behaviour of fibroblasts. *J. Embryol. Exp. Morphol.* **24**, 625–40 (1970).
 29. Liao, G., Nagasaki, T. & Gundersen, G. G. Low concentrations of nocodazole interfere with fibroblast locomotion without significantly affecting microtubule level: implications for the role of dynamic microtubules in cell locomotion. *J. Cell Sci.* **108**, (1995).
 30. Sarhan, A. R. *et al.* Quantitative Phosphoproteomics Reveals a Role for Collapsin Response Mediator Protein 2 in PDGF-Induced Cell Migration. doi:10.1038/s41598-017-04015-x

31. Foy, M., Anézo, O., Saule, S. & Planque, N. PRL-3 / PTP4A3 phosphatase regulates integrin β 1 in adhesion structures during migration of human ocular melanoma cells. *Exp. Cell Res.* **353**, 88–99 (2017).
32. Yoo, J. H. *et al.* ARF6 Is an Actionable Node that Orchestrates Oncogenic GNAQ Signaling in Uveal Melanoma. *Cancer Cell* **29**, 889–904 (2016).
33. Marchesin, V. *et al.* ARF6–JIP3/4 regulate endosomal tubules for MT1-MMP exocytosis in cancer invasion. *J. Cell Biol.* **211**, 339–358 (2015).
34. Krndija, D. *et al.* The phosphatase of regenerating liver 3 (PRL-3) promotes cell migration through Arf-activity-dependent stimulation of integrin α 5 recycling. *J. Cell Sci.* **125**, 3883–92 (2012).
35. Shimada, K. *et al.* Collapsin response mediator protein 2 is involved in regulating breast cancer progression. *Breast Cancer* **21**, 715–23 (2014).
36. Wu, C. C. *et al.* Identification of collapsin response mediator protein-2 as a potential marker of colorectal carcinoma by comparative analysis of cancer cell secretomes. *Proteomics* **8**, 316–332 (2008).
37. Moutal, A. *et al.* CRMP2 Phosphorylation Drives Glioblastoma Cell Proliferation. *Mol. Neurobiol.* 1–14 (2017). doi:10.1007/s12035-017-0653-9
38. Moutal, A. *et al.* Efficacy of (S)-Lacosamide in preclinical models of cephalic pain. *Pain reports* **1**, (2016).
39. Georgiadou, M. *et al.* AMPK negatively regulates tensin-dependent integrin activity. *J. Cell Biol.* **216**, 1107–1121 (2017).
40. Bausch, A. R., Möller, W. & Sackmann, E. Measurement of local viscoelasticity and forces in living cells by magnetic tweezers. *Biophys. J.* **76**, 573–9 (1999).

41. Chan, C. J. *et al.* Myosin II Activity Softens Cells in Suspension. *Biophys. J.* **108**, 1856–1869 (2015).

Acknowledgments

We would like to thank Marie-Noëlle Soler, Charlène Lasgi, and André Nicolas for their technical advice and support.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: SS, FC, NP. Performed the experiments: LD, OA, KM, CL, FC, SS. Analysed the data: LD, KM, JBM, NP, FC SS. Wrote the paper: LD, SS JBM.

Conflicts of interest

The authors declare that they have no competing interests.

Figure legends

Figure 1. PTP4A3 expression reduces CRMP2 phosphorylation

- A) The phosphorylation state of CRMP2 was compared between OCM-1-EGFP-PTP4A3 and OCM1-EGFP-C104S cells by 2D gel electrophoresis. After Western blotting, detection was performed using an anti-CRMP2 antibody that recognizes total CRMP2 or phospho-specific anti-CRMP2 (S522) and anti-CRMP2 (T514) antibodies.
- B) Spot densitometric profiles of phosphorylated CRMP2 were generated using ImageJ64. The grey peaks indicate those present for OCM1-EGFP-C104S cells which are absent from OCM1-EGFP-PTP4A3 cells.

- C) Western blot analysis of total lysates (input) and lysates after phosphoprotein purification as loading controls.

Figure 2. PTP4A3 and CRMP2 interact

- A) Coimmunoprecipitation of PTP4A3 and CRMP2 using a GFP-Trap_A kit. This kit allows the immunoprecipitation of GFP recombinant proteins from OCM-1-EGFP, OCM-1-EGFP-PTP4A3, and OCM-1-EGFP-C104S cells. GFP recombinant protein and binding partners were revealed by Western blotting with anti-CRMP2 and anti-GFP antibodies.
- B) Immunoprecipitation of CRMP2 from OCM-1 cells. After immunoprecipitation, CRMP2 was eluted in three successive fractions. The presence of CRMP2 and its phosphorylation state (T514) was verified by Western blotting.
- C) Phosphatase activity test of GST fusion proteins. The dephosphorylation capacity of GST-PTP4A3 or GST-C104S was assessed by incubation with OMPF substrate and measuring the absorbance at 450 nm.
- D) GST pull-down experiment. Purified phosphorylated CRMP2 was incubated with GST-PTP4A3 and GST-C104S. After the pull-down, the ability of CRMP2 to bind GST fusion proteins was assessed by Western blotting with an anti-CRMP2 antibody and the phosphorylation state of CRMP2 with an anti-CRMP2 (T514).
- E) Quantification of CRMP2 T514 phosphorylation by analysis of the densitometric profiles of the bands using ImageJ64. Band intensity is represented by the peak area. The ratio of peak area of CRMP2 to that of CRMP2 (T514) was determined.

Figure 3. CRMP2 expression downstream of PTP4A3 reduces cell migration and invasiveness

- A) Western blot showing the knockdown of CRMP2 in OCM-1 cells expressing EGFP, EGFP-PTP4A3, or EGFP-C104S. Twenty micrograms of protein extract was loaded. The detection of α -tubulin was performed as a loading control.
- B) The mean overall speed of OCM-1 cells was assessed by a 2D random cell migration assay by time-lapse video microscopy. Data are shown as the mean values \pm SD. \sim 100 cells were tracked per condition. *** $p < 0.001$, Student's t-test.
- C) Western blot showing the knockdown of CRMP2 in human PDX-MP41 cells and endogenous expression of PTP4A3. Twenty micrograms of protein extract was loaded. The detection of β -actin was performed as a loading control.
- D) The mean overall speed of MP41 cells was assessed by a 2D random cell migration assay by time-lapse video microscopy. Data are shown as the mean values \pm SD. \sim 100 cells were tracked per condition. *** $p < 0.001$, Student's t-test.
- E) Quantitative analysis of the relative invasiveness of EGFP-PTP4A3shCtrl and EGFP-PTP4A3shCRMP2 cells. Cells (0.25×10^6) were inoculated into the CAM of chick embryos and the presence of human cells assessed by real-time PCR analysis of chick GAPDH and human alu sequences in the chick femur DNA. Values for the calibrator were arbitrarily defined as 1. The graphs show the means \pm SD. * $P < 0.05$ (embryos = 14/cell line), Student test.
- F) MMP14 localization on the cell surface assessed by flow cytometry of nonpermeabilized OCM-1 cells. (**** $p < 0.0001$), Student test.

Figure 4. CRMP2 affects the actin network

- A) Visualization of the actin cytoskeleton network in OCM-1 cells as assessed by Phalloïdin staining. After deconvolution, images were processed using ImageJ64. Scale bar = 10 μ m.

- B) Quantification of the number of fragments of < 40 adjoining pixels normalized to the cell area in OCM-1 cells. Data are shown as the mean values +/- SEM. ~20 cells were analyzed. ***p < 0.001, **p < 0.01, Student's t-test.
- C) Visualization of the actin cytoskeleton network in OCM-1 cells as assessed by Phalloidin staining of cells treated with Y27632 for 24 h. After deconvolution, images were processed using ImageJ64.
- D) Quantification of the number of fragments of < 40 adjoining pixels normalized to the cell area in OCM-1 cells treated or not with Y27632. Data are shown as the mean values +/- SEM. ~60 cells were analyzed. ***p < 0.001, * p < 0.01, * p < 0.05, Student's t-test.
- E) The mean overall speed of OCM-1 cells treated with Y27632 as assessed by a 2D random cell migration assayed by time-lapse video microscopy. Data are shown as the mean values +/- SD. ~100 cells were tracked per condition. ***p < 0.001, **p < 0.01, Student's t-test.

Figure 5. CRMP2 affects the microrheological properties of the cells

- A) Sketch of the microrheology experiments. A 2- μm -diameter bead internalized in the cell is trapped with an optical tweezer. At time $t = 0$ s, the microscope stage is moved in a $X_s = 0.5$ - μm step displacement. After the initial rapid displacement of the bead from the trap center, the bead position $x_b(t)$ relaxes towards the center of the optical trap, which acts as a spring. Single particle tracking of the bead allows determination of the viscoelastic relaxation curves shown in B.
- B) Average bead displacement curves showing viscoelastic relaxation of the bead towards the trap center following a 0.5- μm step displacement of the microscope stage for OCM-1-EGFP-PTP4A3 and OCM1-EGFP-C104S cells treated with shCtrl or shCRMP2.
- C) Quantification of the relaxation curves using a phenomenological model-independent approach (upper graphs) yielding the rigidity index and the bead-step amplitude, and the

Standard Linear Liquid (SLL) viscoelastic model (lower graphs) yielding the elasticity and viscosity of the cytoplasm.

Data were obtained from N = 16 and 14 beads for the OCM-1-EGFP-PTP4A3 cells treated with shCtrl or shCRMP2, respectively, and from N = 13 and 18 beads for OCM1-EGFP-C104S cells treated with shCtrl or shCRMP2, respectively. Error bars represent the standard error. p-values were determined using Student's t-test for unpaired samples (**p < 0.001, *p < 0.05).

Figure 6. CRMP2 expression by uveal melanoma tumors

- A) PTP4A3 and CRMP2 expression were determined by microarrays analysis. Specimens were analyzed on GeneChip Human Genome U133 Plus 2.0 microarrays (Affymetrix) as described previously⁷. PTP4A3 and CRMP2 expression are inversely correlated in tumors (Spearman coefficient of -0,4). 63 tumors were analysed, each one divided in two groups : the red dots correspond to meta0 tumors (low metastatic risk) and blue dots to meta1 tumors (high metastatic risk).
- B) Effect of CRMP2 expression on UM survival. Kaplan-Meier analysis of CRMP2 expression in 80 uveal melanoma tumors from the TCGA database (<http://ualcan.path.uab.edu/index.html>).

Figure 7. Model for the regulation of PTP4A3 and CRMP2 expression in uveal melanoma cells

The phosphatase PTP4A3 dephosphorylates CRMP2 on the T514 affecting cytoskeleton (microtubule function and actin fibers formation) which affect cells micro-rheological properties and MMP14 membrane accumulation leading to an increase of both migration and invasion.

Arrow : activation, blind-ended arrow : inhibition.

Supplemental Figure 1

Western blot showing the decrease of phosphorylated cofilin (S9) levels in OCM-1 cells treated with Y27632, confirming the inhibition of ROCKII. Twenty micrograms of protein extract was loaded. The detection of total cofilin was performed as a loading control.

Supplemental Figure 2

- A) Visualization of the microtubule network in OCM-1 cells as assessed by tubulin immunofluorescence after PFA fixation. Cells were treated with nocodazole and microtubule repolymerization followed for T0, 5, and 10 minutes after drug rinse. After deconvolution, images were processed using ImageJ64. Scale bar = 10 μ m.
- B) Quantification of the number of fragments of < adjoining 40 pixels normalized to the cell area in OCM-1 cells at T5. Data are shown as the mean values +/- SEM. ~20 cells were analyzed. *p < 0.05, Student's t-test.
- C) Quantification of the percentage of cells with an aster at T5. Data are shown as the percentage +/- SD. ~20 cells were analyzed. **p < 0.01, *p < 0.05, Student's t-test.

Figure 1 : PTP4A3 expression reduces T514 CRMP2 phosphorylation

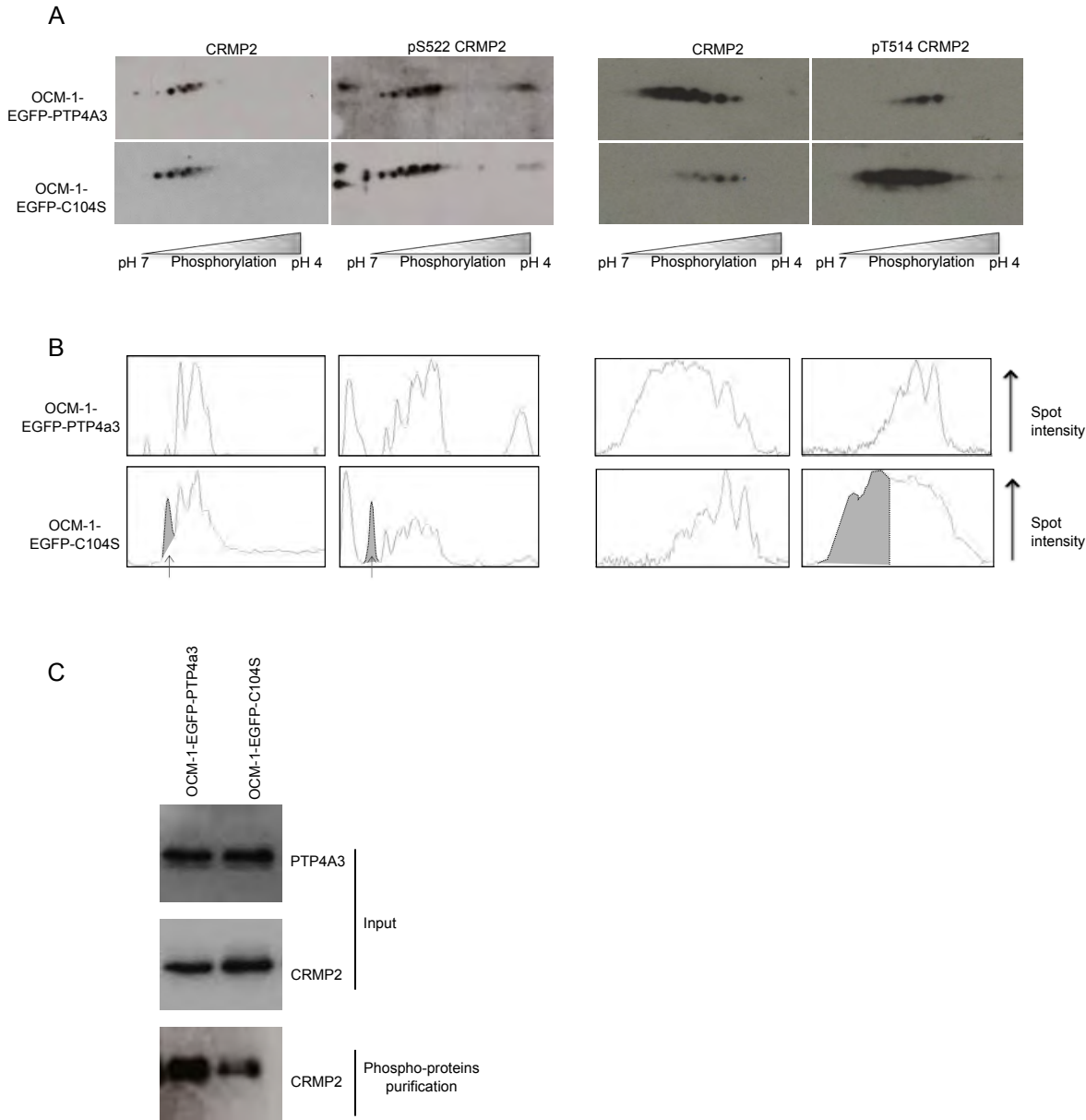


Figure 2 : PTP4A3 and CRMP2 interact

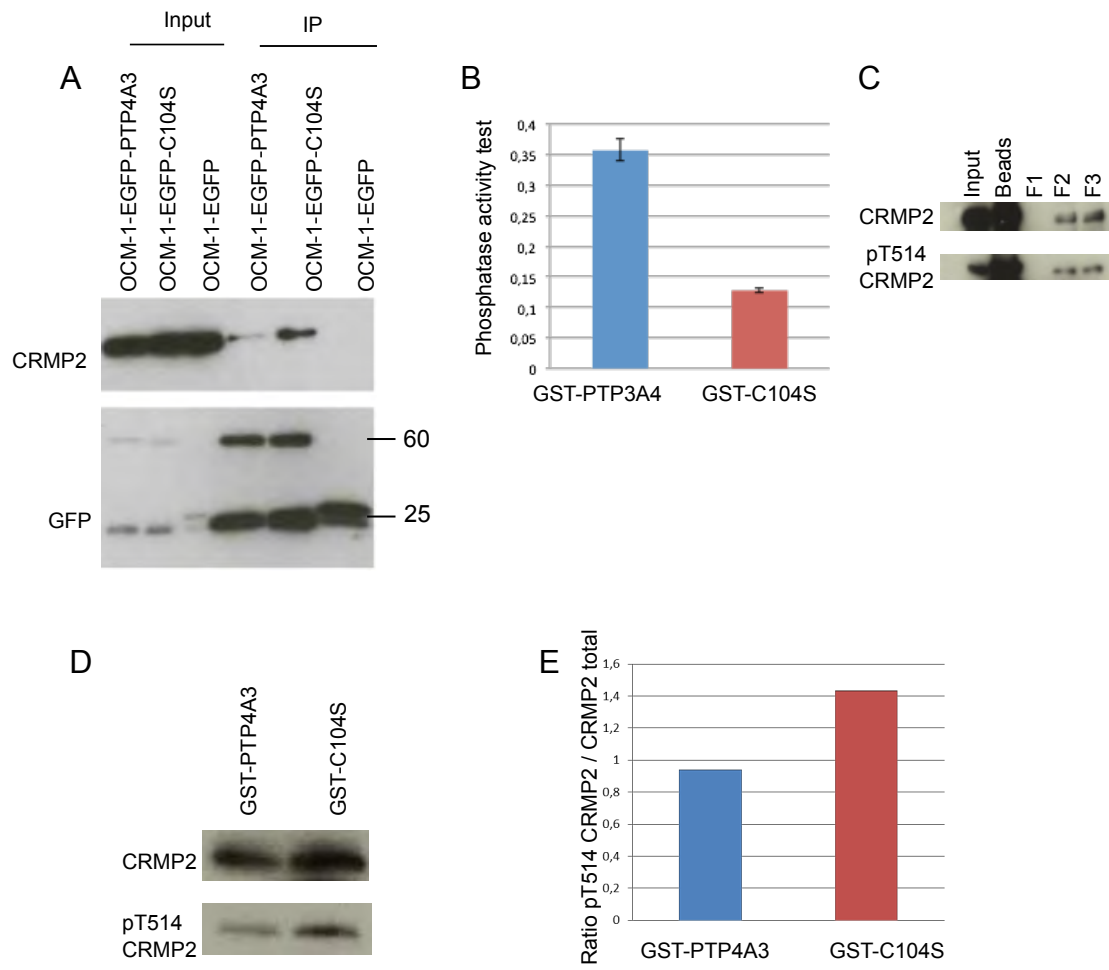


Figure 3 : CRMP2 expression downstream of PTP4A3 reduces cell migration and invasiveness

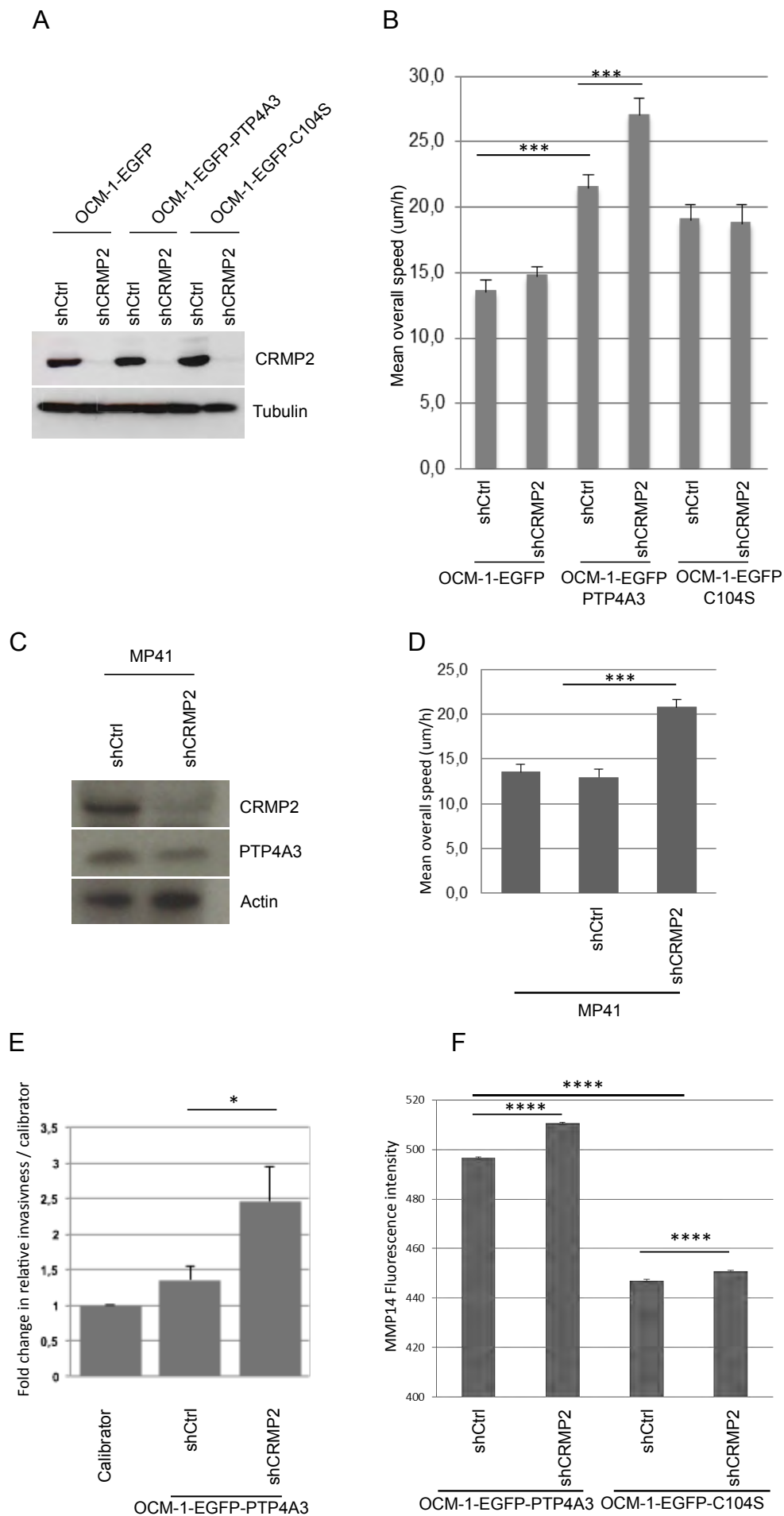


Figure 4 : CRMP2 affects actin network

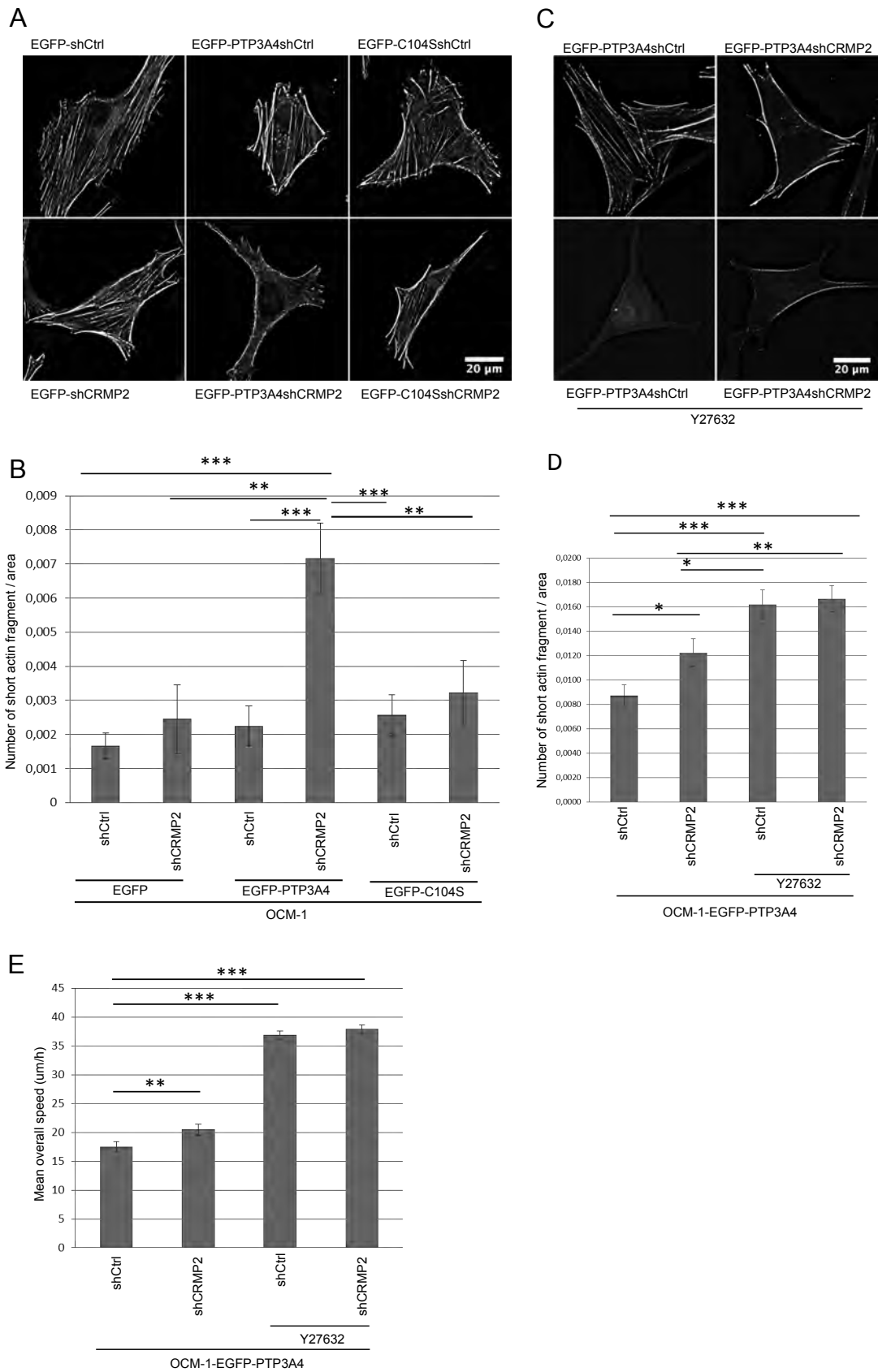


Figure 5 : CRMP2 affects the micro-rheological properties of the cells

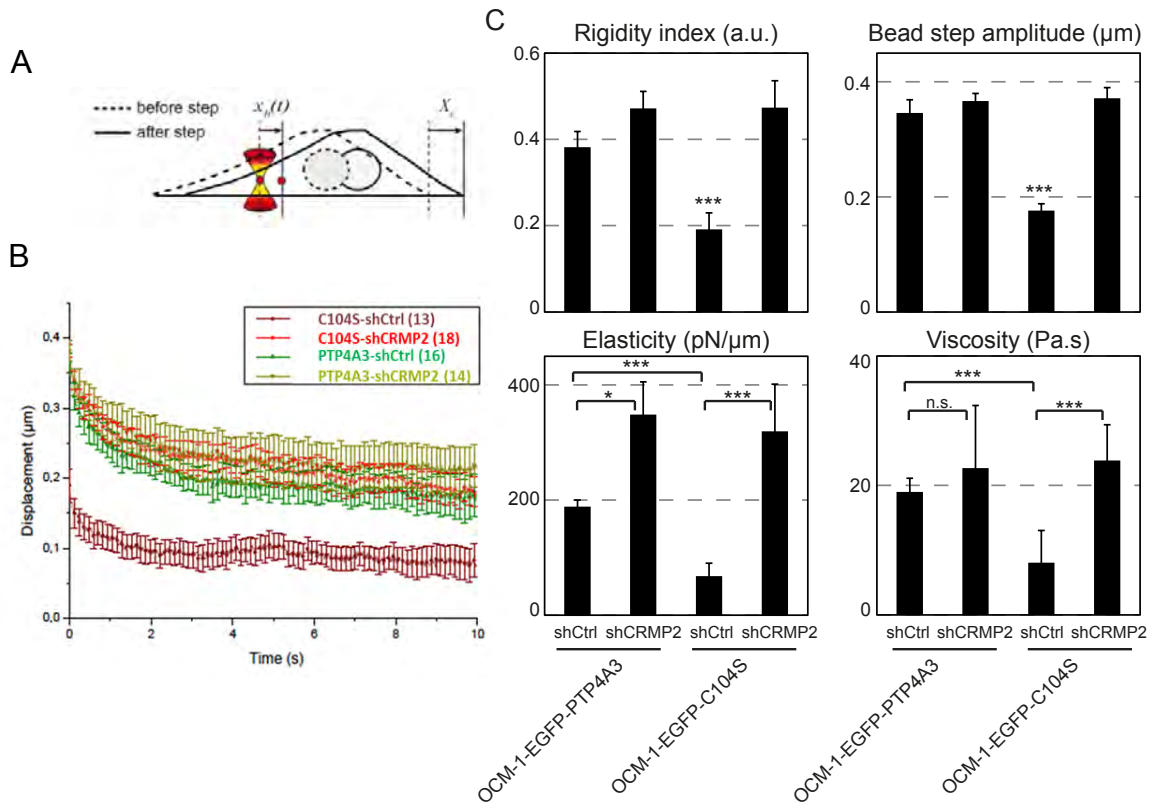


Figure 6 : Correlation between CRMP2 expression and uveal melanoma survival

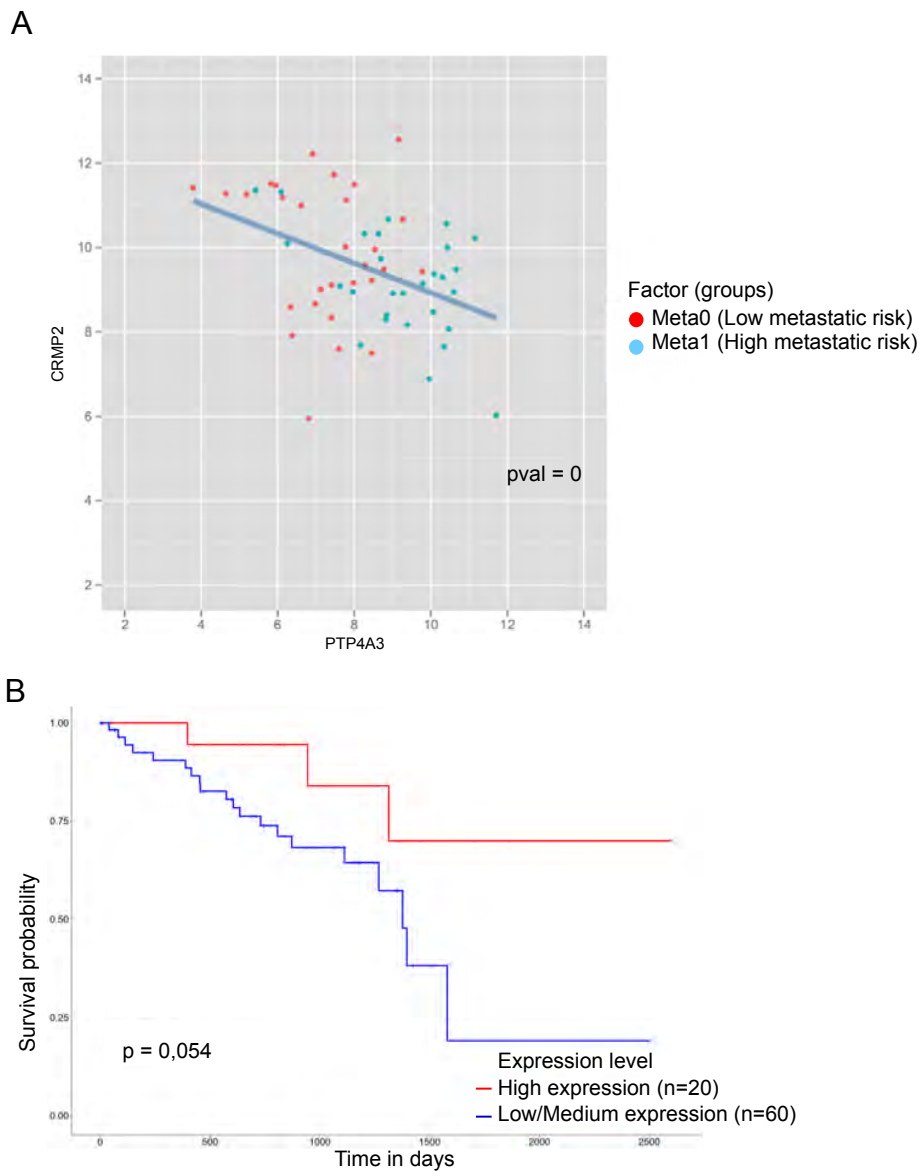
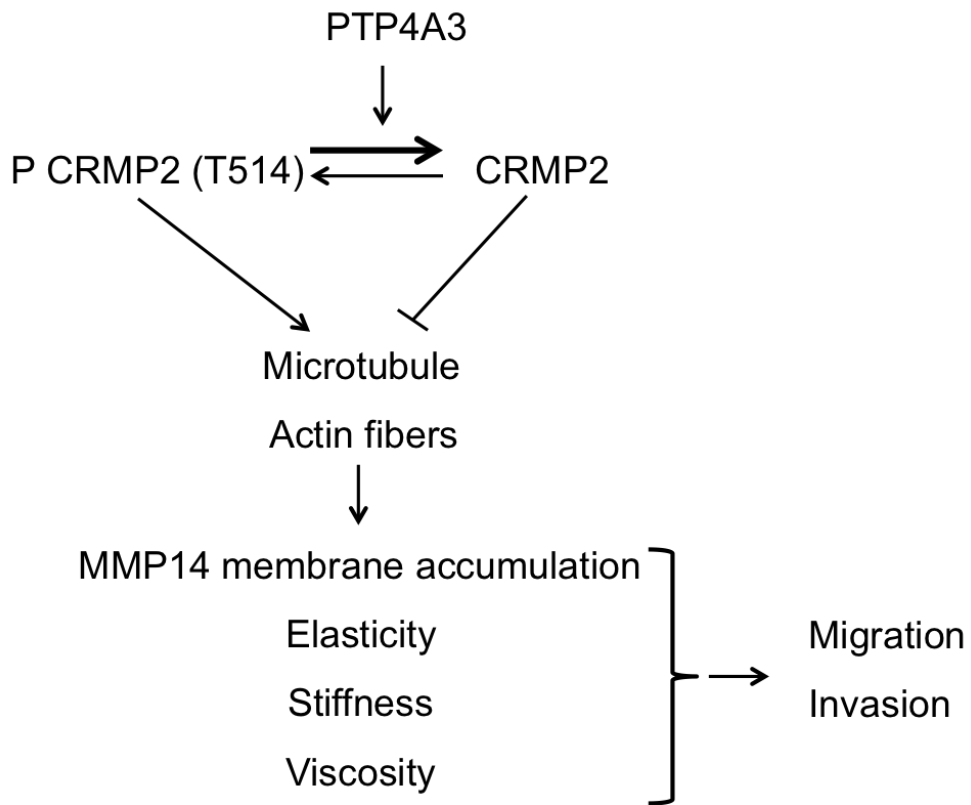
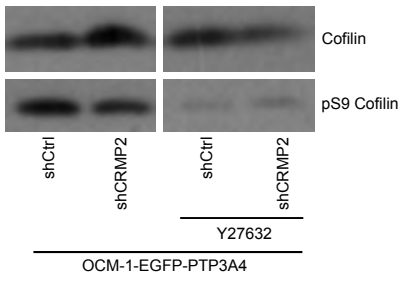


Figure 7 : Regulation model of PTP4A3 on CRMP2 in uveal melanoma cells



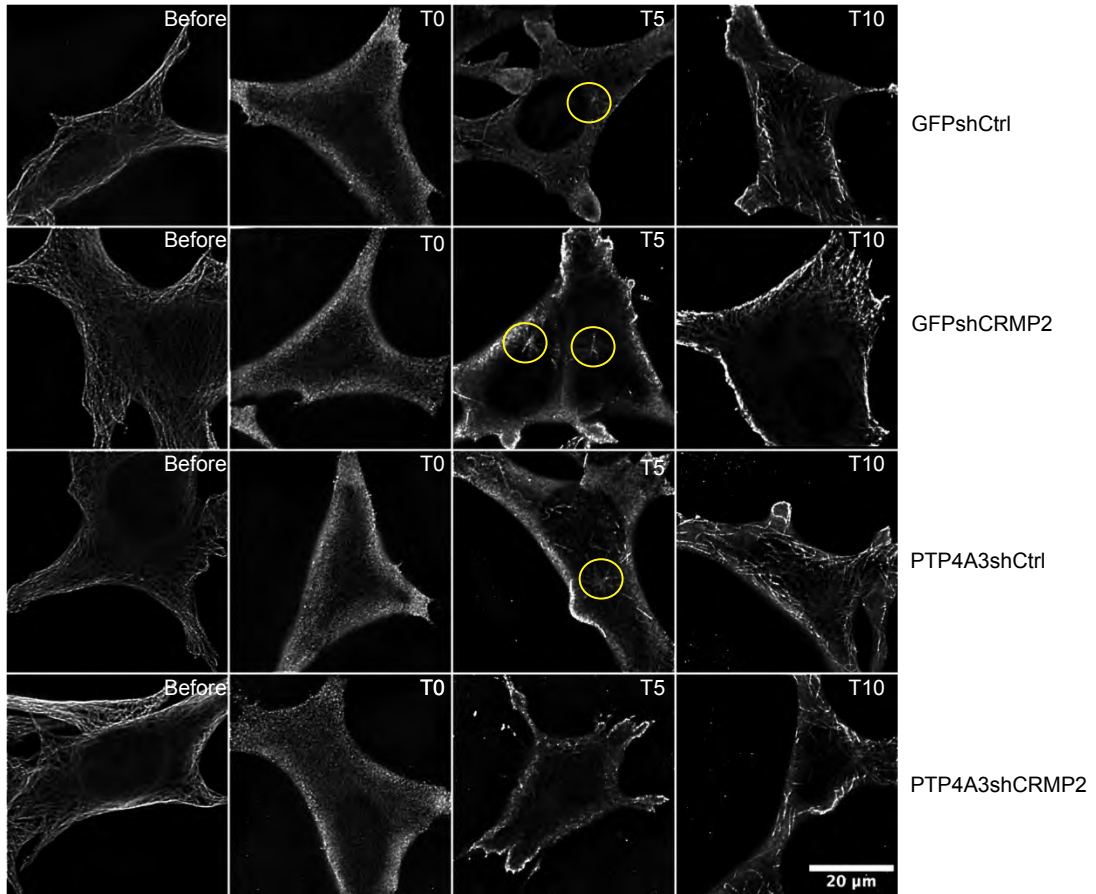
Supplemental figure 1

A

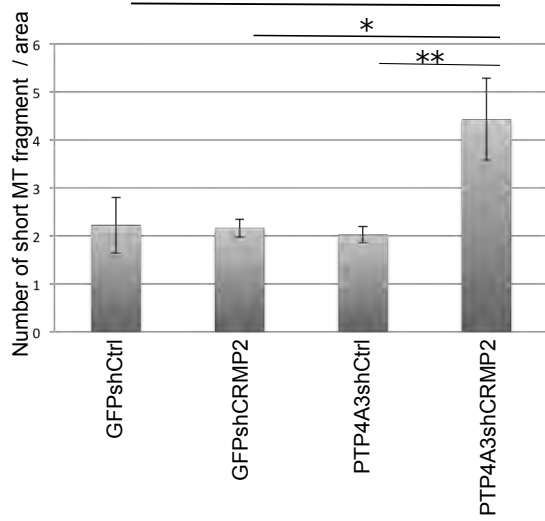


Supplemental figure 2 : CRMP2 affects microtubules dynamics

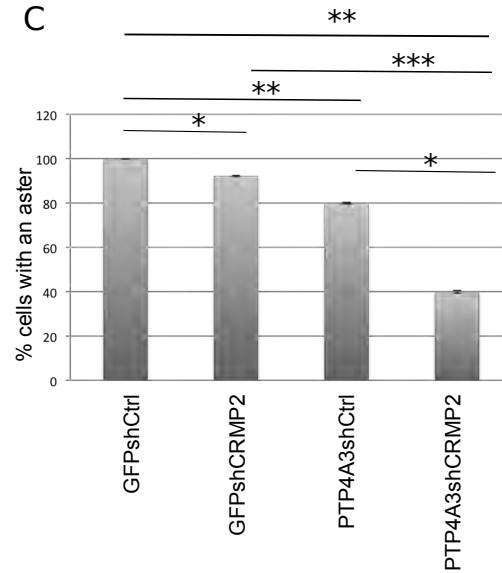
A



B



C



Partie II : La phosphatase PRL-3 est un acteur central des étapes clés de la tumorigenèse et du développement métastatique

Revue à soumettre

The phosphatase PRL-3 is involved in all the key steps of the metastatic process.

Laura DUCIEL¹, Gomez Luis Cristobal MONRAZ, Inna KUPERSTEIN, Simon SAULE.

Préambule sur la biologie systémique et le projet NaviCell :

La biologie systémique ou biologie intégrative vise à intégrer différents niveaux d'informations pour comprendre comment fonctionne un processus ou système biologique.

L'un des objectifs le plus important de la biologie systémique est de développer un langage commun pour la représentation formel des connaissances en biologie moléculaire. Actuellement, la plupart des informations concernant les mécanismes de biologie moléculaire sont dispersés dans les milliers de publications scientifiques, ce qui limite leur analyse bioinformatique et par les outils de la biologie systémique.

Une des approches mise en œuvre pour formaliser les connaissances biologiques est de les collecter dans des bases de données telles que : Reactome, KEGG PATHWAYS, Panther, SPIKE, WikiPathways, TransPath, BioCyc et d'autres. La plupart de ces bases de données permettent d'explorer les mécanismes moléculaires visuellement, quelques-uns inclus des outils analytiques pour analyser leur structure [525].

Une approche parallèle consiste à créer une représentation graphique des mécanismes biochimiques sous la forme d'une carte des interactions moléculaire. L'idée de la cartographie des processus moléculaires est apparue au tout début de la biologie moléculaire. Les premières cartes sur le métabolisme, le cycle cellulaire, la réparation à l'ADN ont été créés manuellement dans les années 60 sans aucune base de donnée. De telles cartes peuvent être considérées comme une collection de diagrammes, chacun décrivant un processus cellulaire particulier, regroupés dans un ensemble ou les acteurs moléculaires et leurs groupes occupent un « territoire » propre. Cette représentation géographique possède certains avantages par rapport aux représentations des bases de données dans lesquelles il n'est pas possible d'avoir une visualisation globale des voies de signalisation ni des liens entre elles.

Une avancée significative de la biologie systémique a été la combinaison de ces deux approches pour la formalisation des connaissances en une seule. Dans ce but, il a été nécessaire de développer un langage graphique (compréhensible par l'humain), un langage informatique (dans lequel le langage graphique peut être cartographié) et un logiciel permettant la schématisation d'une très grande carte contenant les interactions moléculaires et qui va créer simultanément un fichier informatique servant de base de donnée. Ces challenges ont inspirés la création d'outils comme CellDesigner [526] (langage SBGN) pour la

Résultats

représentation graphique de diagrammes biologiques et BioPAX (langage SBML) pour l'échange de contenu des bases de données [527].

Le logiciel NaviCell (<http://navicell.curie.fr>) a ainsi été développé et présente les avantages suivants (Figure V.2):

- une navigation web facile de type Google Maps à travers le contenu de l'ensemble des interactions moléculaires
 - la visualisation de la carte à différentes échelles lisibles grâce à un zoom
 - la possibilité d'avoir un retour des utilisateurs sur le contenu de la carte de façon interactif
- NaviCell offre également un forum de discussion sur le contenu de la carte pour la communauté.

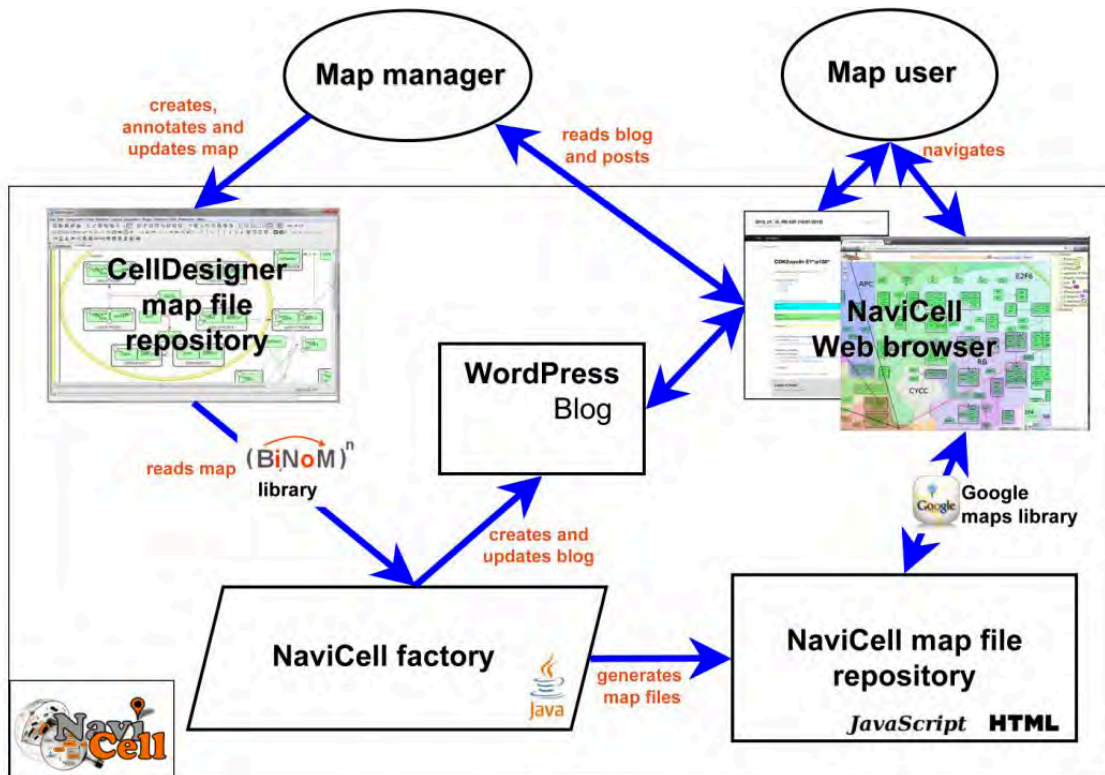


Figure V.2 : Architecture générale de l'environnement de NaviCell.

Figure et légende d'après (Kuperstein et al., 2013).

NaviCell utilise le logiciel CellDesigner pour créer les représentations graphiques qui permet de représenter les différentes entités (protéines, ARN, ADN, récepteur, etc...) existantes au sein d'une cellule mais également les différentes modifications possibles de ces entités (phosphorylation, glycosylation, dégradation, etc...) ainsi que les différents compartiments cellulaire. Une fois que la représentation schématique d'un processus donné est terminée sur CellDesigner, celle-ci est convertie, via NaviCell factory, en fichier html et Javascript qui sont nécessaire pour la construction du site web NaviCell. Les mécanismes moléculaires sont décrits sur la carte, formant un atlas interactif, en représentant l'ensemble des interactions biochimiques des différentes molécules [528](Figure V.3).

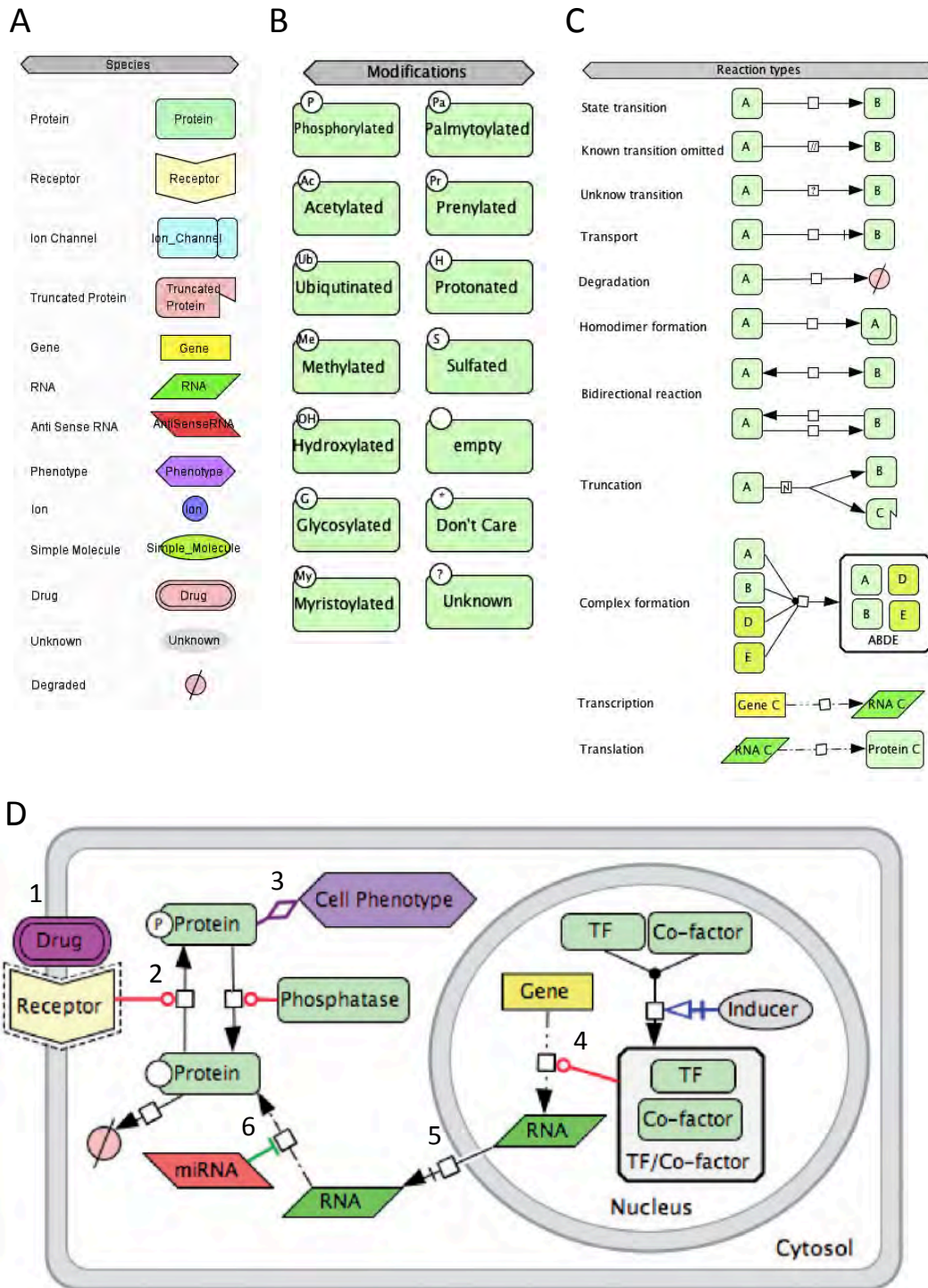


Figure V.3 : Construction d'une carte avec Celldesigner.

A Liste des différentes entités et leur représentation schématique.

B Liste des modifications possibles d'une protéine et leur représentation.

C Liste des différents types de réactions possibles

D Modèle de schématisation sur Celldesigner : Une drogue se fixe sur un récepteur transmembranaire (1) et va induire la phosphorylation d'une protéine (2). La protéine phosphorylée aboutit à un phénotype donné (3). L'expression de cette protéine est induite dans le noyau par le complexe TF/Co-facteur (4), L'ARNm est ensuite transloqué dans le cytoplasme (5) et traduit en protéine. Un miARN est capable de bloquer la transduction (6).

Figure et légende d'après (Kondratova et al., 2018) et Celldesigner Startup guide 4.3

NaviCell a ainsi permis la création de cartes très variées telles que : la voie de signalisation mTOR, la maladie de Parkinson, le métabolisme du fer dans les cellules de mammifères et beaucoup d'autres. Mais NaviCell a également permis de construire la base de donnée ACSN (Atlas cancer of signalling Network). ACSN est une ressource qui contient une collection de cartes interconnectées regroupant tous les mécanismes et voies de signalisation impliqué dans le cancer. Les objectifs d'ACSN sont de :

- Construire une ressource organisée qui contient tous les résultats biologiques synthétisés de plusieurs équipes de recherche
- Partager les informations et discuter des mécanismes des procédés biologiques
- Créer un outil analytique pour l'intégration et l'analyse de données haut débit

Actuellement l'Atlas d'ACSN se compose de cinq cartes dans lesquelles les processus cellulaires majeurs impliqués dans les cancers sont représentés : réparation de l'ADN, cycle cellulaire, EMT et motilité, Survie et apoptose [529] (**Figure V.4**).

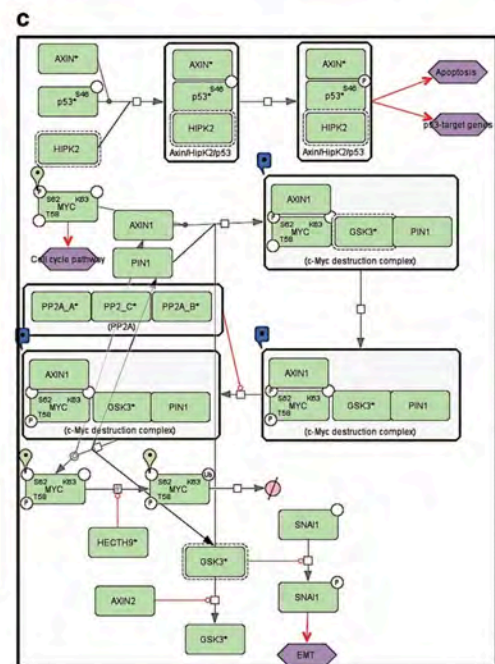
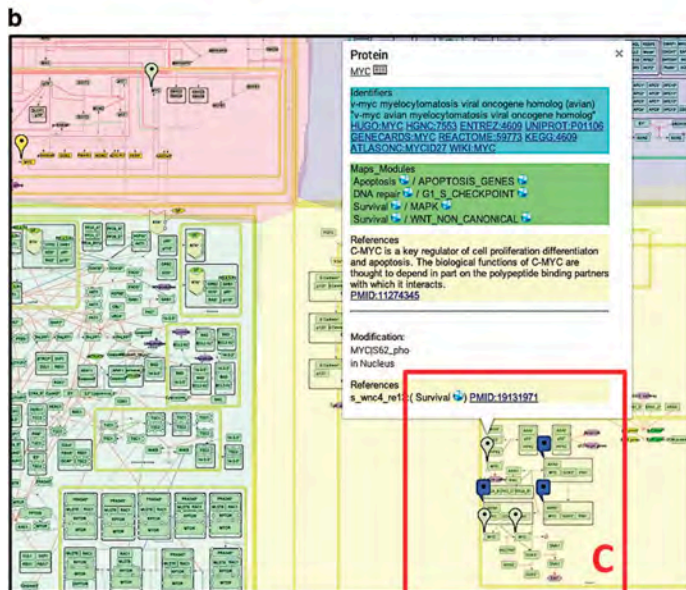
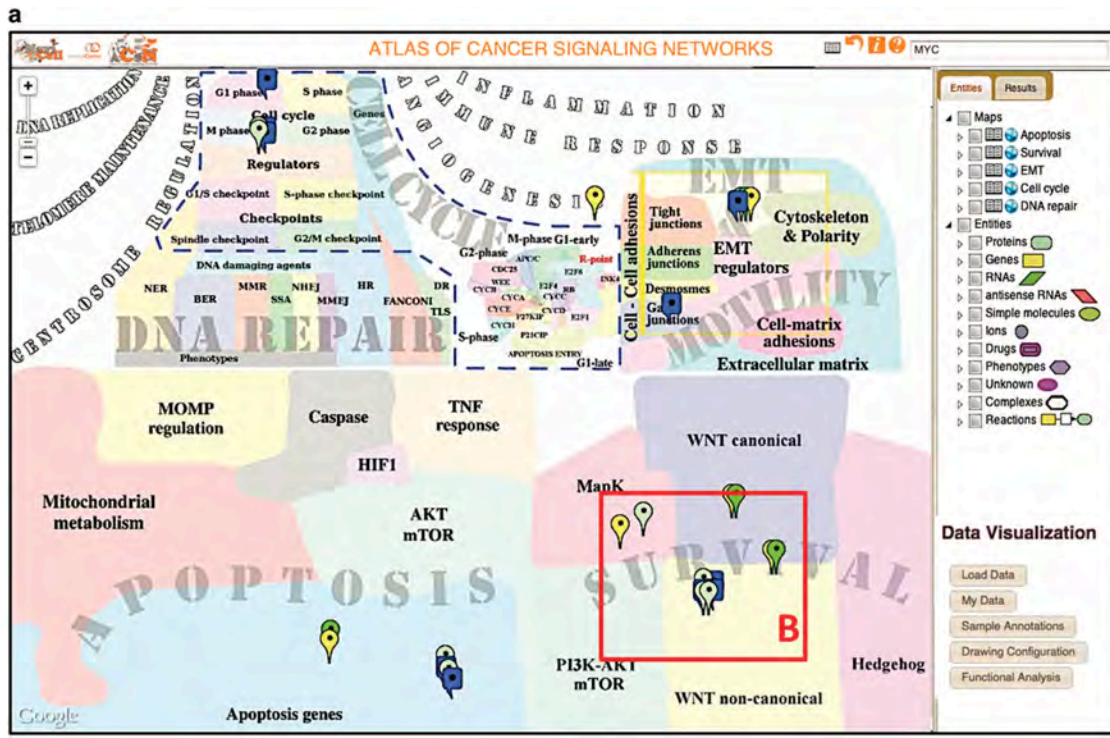


Figure V.4 : L'interface d'ACSN.

a) L'interface d'ACSN inclut la carte et à droite se trouvent : un panel de sélection des différentes entités, un panel de d'analyse de données (Data Visualization) et en haut une barre de recherche pour trouver une protéine d'intérêt.

b) Agrandissement d'une partie de la carte. La sélection d'une entité permet l'ouverture d'une fenêtre contenant : des liens menant à d'autres bases de données (Identifiers), des liens permettant d'accéder à tous les modules de la carte dans lesquelles cette entité est présente (Map Modules), des liens donnant des références pubmed (References).

c) Agrandissement d'une partie d'un module qui montre la voie Wnt non canonique de la carte « survie ». Il s'agit du niveau le plus détaillé de la carte.

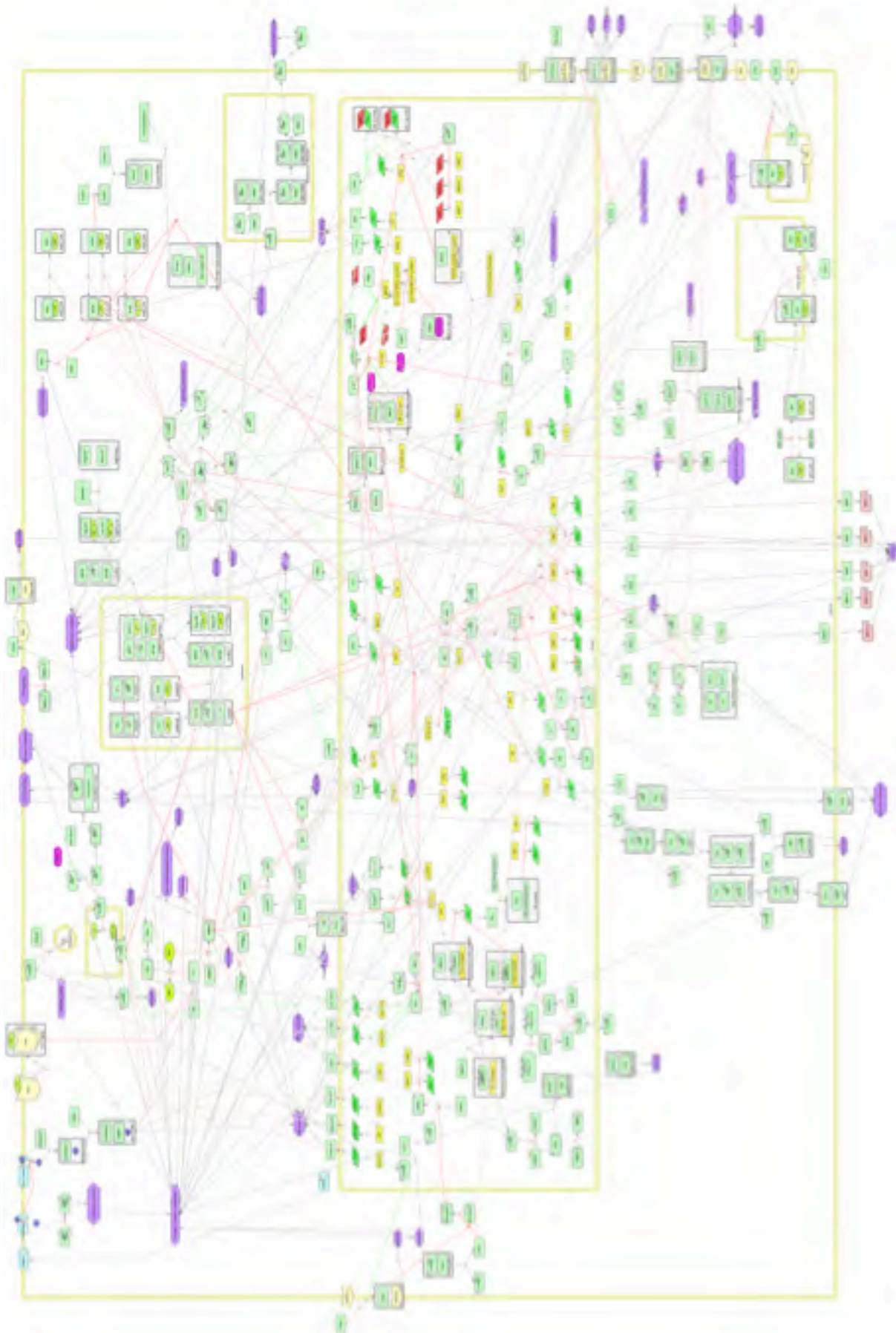
Figure et légende d'après (Kuperstein et al., 2015).

Une autre partie de mon projet, réalisé en collaboration avec Inna Kuperstein, visait à établir une carte du réseau d'interaction des molécules et des voies de signalisation impliquant PRL-3 dans le développement du cancer en utilisant Celldesigner et visant à être intégré à ACSN (**Figure V.5**).

La création de cette carte a donné lieu à la rédaction d'une revue dans laquelle l'analyse de la carte a été réalisée à du plugin BiNoM 2.5 du logiciel Cytoscape 2.7.0. BiNoM est un outil analytique dont le but est de réduire la complexité des réseaux biologiques en extrayant certaines parties pour créer des sous-groupe de réseaux plus lisible et compréhensible. BiNoM permet également d'analyser la carte, par exemple, en trouvant le « chemin » le plus court entre deux entités ou bien en trouvant toutes les voies qui ne contiennent pas de boucles d'autorégulation (self-intersecting paths) [530].

Figure V.5 : Carte des molécules et voies de signalisation régulées par PRL-3 dans les cancers.

Carte réalisée à l'aide du logiciel Celldesigner.



Résumé :

La formalisation des données issues de la littérature sous forme d'une carte regroupant l'ensemble des voies de signalisation et protéines impliquées dans les cancers en lien avec la phosphatase PRL-3 a été réalisée à partir de 63 références issues de la littérature. La carte contient ainsi : 784 entités dont 141 protéines et 342 réactions chimiques. L'analyse de cette carte a ensuite été réalisée avec BiNoM 2.5 et a permis de montrer que PRL-3 est un acteur central qui contrôle les étapes clés impliquées dans la tumorigenèse et le développement métastatique :

- cycle cellulaire via le contrôle de la voie p53
- survie et prolifération via les voies MAPK, mTOR, STAT3
- angiogenèse via la voie VEGF
- adhérence via la voie Erk
- remodelage du cytosquelette via les RhoGTPase
- TEM et motilité via la voie Akt
- Invasion via la voie Src

Ce contrôle s'exerce également par la régulation de nombreux effecteurs tels que la E-cadhérine pour la TEM, les intégrines pour d'adhérence, les MMPs pour l'invasion et certaines protéines régulatrices du cytosquelette pour son remodelage.

The phosphatase PRL-3 is involved in key steps of metastasis in cancer

Laura DUCIEL^{1,2*}, Luis Cristobal MONRAZ GOMEZ^{3,4,5*}, Inna KUPERSTEIN^{3,4,5} and Simon SAULE^{1,2}

1. Institut Curie, PSL Research University, Centre National de La Recherche Scientifique (CNRS), Institut National de la Santé Et de la Recherche Médicale (INSERM), Unité Mixte de Recherche 3347 (UMR), Unité 1021 Orsay, France. 2. Université Paris Sud, Université Paris-Saclay, Centre National de La Recherche Scientifique, Unité Mixte de Recherche 3347, Unité 1021, Orsay, France. 3. Institut Curie, PSL Research University, F-75005 @Paris, France. 4. INSERM, U900, F-75005 Paris, France. 5. MINES ParisTech, PSL Research University, CBIO-Centre for Computational Biology, F-75006 Paris, France.

*These authors have equal contributions

Co-corresponding authors:

Simon SAULE
Institut Curie, Section Recherche
UMR3347/U1021
Campus Universitaire d'Orsay Bâtiment 110
91405 Orsay Cedex
Tél : 00 33 (1) 69 86 71 53
Fax : 00 33 (1) 69 86 30 51

Inna Kuperstein
U900 Institut Curie – INSERM - Mines ParisTech
Department of Bioinformatics and Computational Systems Biology of Cancer
Institut Curie - 26 rue d'Ulm - 75248 PARIS cedex 05 - France
Inna.kuperstein@curie.fr
Tel : +33 (0) 1 56 24 69 87
<http://www.curie.fr> <http://u900.curie.fr> <http://sysbio.curie.fr>

Summary

PRL-3 belongs to the PRL phosphatases family. Although, the physiological role of this phosphatase is poorly known, numerous studies showed that PRL-3 is a marker of cancer progression and is associated with metastasis development. The evidences about implication of PRL-3 in various steps of metastatic process as cell cycle, survival, angiogenesis, adhesion, cytoskeleton remodelling, EMT, motility and invasion were reported. In addition, a number of direct or indirect substrates molecules were discovered. However, this information is dispatched across numerous papers and the holistic picture is missing. Therefore, we systematically collected information from the literature and depicted this knowledge in the form of comprehensive signalling network map. The analysis of the network map allowed us to retrieve signalling pathways through which PRL-3 is governing the key steps of metastatic process in cancer. In this review we summarise the current view on PRL-3 in the cancer and molecular mechanisms involved.

Introduction

Tumorigenesis is a gradual multistep process that enables cells to acquire new biological capacities that will allow tumor formation and dissemination for metastases formation^{1,2}. The first step corresponds to cellular transformation and tumor growth due to an uncontrolled proliferation. This proliferative capacity is acquired by apoptosis resistance, cell cycle deregulation and pathways

involved in cell survival. Then, deregulations of angiogenic pathways allow the neovascularization of the tumor, which is important for tumor growth but also for metastatic colonization. Finally, to invade distant organs, tumor cells have to acquire migration capacity, which is provided by the EMT associated with cytoskeleton reorganization and modification of cellular adherence³.

Multiple signalling pathways are implicated in this sequence of events promoting an evolution from normal cell to invading cancer cell. Among others, PTPs (protein tyrosine phosphatases) that constitute a large family of enzymes playing crucial roles in the regulation of key signalling pathways involved in the control of cell proliferation, adhesion, migration, differentiation and survival and apoptosis⁴. Deregulation of PTP activity leading to aberrant tyrosine phosphorylation has been implicated in the progression of various diseases, including cancer⁵.

PRLs (Phosphatases of regenerating liver) are dual-specificity phosphatases (DSP), which is a subgroup of PTPs. The PRLs are small proteins (22 kDa) closely related since they show at least 75% homology in amino acid sequence⁶. PRLs are conserved during evolution and are expressed during the embryonic development⁷ especially in skeletal muscle in vertebrates⁸. The PRLs have a N-terminal catalytic domain containing the PTP active site sequence CX5R, in which the cysteine is the catalytic residue⁹, and a C-terminal CAAX prenylation sequence important for membrane association and intracellular localization⁹. In fact, prenylated PRLs are associated with the plasma membrane, the early endosomes and autophagosomes but non-prenylated PRLs are redistribute to the nucleus¹⁰⁻¹³. The phosphatase of regenerating liver-3 (PRL-3) or Protein tyrosine phosphatase 4A3 (PTP4A3) belongs to the PRL phosphatases family comprising three members: PRL-1, PRL-2 and PRL-3. The gene responsible for encoding PRL-3 protein is located in the 8q24.3 chromosome. In human adult tissues, PRL-3 is mostly expressed in skeletal muscle and heart and at a lower levels in other tissues such as retina, liver and pancreas¹⁴.

Little is known about the physiological roles of the PRLs, but all of them have been shown to be implicated in cell proliferation, migration, invasion, tumor growth and metastasis⁶. Interestingly, the inhibition of prenylation and therefore the relocalization of PRLs in the nucleus abolish their pro-migratory and pro-metastatic effects in cancer¹⁵⁻¹⁸. PRL-3 was the first member of the PRLs to be found overexpressed in liver metastasis from colon cancer compare with colon tissue or primary tumors¹⁹. PRL-3 is the most described PRLs member because the phosphatase was found most frequently overexpressed in cancers. Currently, it is known that PRL-3 is involved in the metastatic process of multiple human cancers: gastric cancers²⁰, ovarian cancers^{21,22}, cervix cancer²³, non-small cell lung cancer²⁴, liver cancer^{25,26}, human gliomas²⁷, nasopharyngeal carcinoma²⁸, esophageal cancer²⁹, metastatic colorectal carcinomas (CRCs)^{30,31}, breast cancer³², uveal melanoma³³, cervical cancer³⁴, salivary adenoid cystic carcinoma³⁵ but also myeloid leukemia³⁶ and multiple myeloma³⁷.

Nevertheless, its mechanism of action and its intracellular substrates remain largely unknown, evoking numerous studies about PRL-3 substrates, pathways and mechanisms in which the phosphatase is involved. We used a systems biology approach and integrated published evidence on molecular mechanisms implicating PRL-3 into a comprehensive map of molecular interactions. We further performed a structural network analysis to elucidate the main players in the different key steps of metastasis. The analysis of the network map allowed us to retrieve signalling pathways through which PRL-3 is governing these processes. This work helped us to produce the current review where we describe the action of PRL-3 that allows cells to acquire the biological capabilities involved in tumor development and invasion.

Signalling network map construction and analysis

We manually retrieved scientific results about the PRL-3 from the literature and systematically gathered them together into a comprehensive signalling map (Supplementary Figure 1). We conducted a literature search to identify papers in which PRL-3 was studied. We used the keywords “PRL-3” and “PTP4A3” and selected the references that link the phosphatase to cancer. All the scientific results in these references were then graphically depicted as biochemical reaction network using the Cell Designer tool³⁸ and the Systems Biology Graphical Notation³⁹, to describe the biological processes. The software creates a structured network representation in the Systems Biology Markup Language⁴⁰, which allows to perform further computational analyses. The signalling map is available at: https://acs.n.curie.fr/navicell/maps/invasion_motility/master/index.html).

In order to identify pathways which regulate various phenotypes, we used the BiNoM⁴¹ plugin in Cytoscape⁴² to perform a path analysis in the map by OCSANA algorithm⁴³. Such path analysis was performed to extract the main signalling pathways that lead to metastasis (e.g. “Invasion”, “Angiogenesis”, etc.) and implicate PRL-3. The identified paths in the networks guided further complexity reduction of the network, by maintaining the first order connections, but removing from the network un-related processes. This reduction allows to understand the organization principles of the map and to identify the key paths. In this way, the major players connecting PRL-3 and the six major phenotypes of interest (cell cycle, survival, angiogenesis, adhesion, cytoskeleton remodeling, EMT and motility and invasion), were retrieved. The diagrams of reduced models related to the regulation of the six aforementioned phenotypes are used to illustrate the messages in the review.

PRL-3 signalling in cell cycle, survival and apoptosis

PRL-3 has been observed to be involved in tumor development by controlling cell cycle and therefore, apoptosis and survival. While p53 is known to affect the transcription of the PRL-3 gene⁴⁴, PRL-3 is also able to down-regulate p53 in cancer cells by inducing the transcription of PIRH2 and increasing the phosphorylation of MDM2, being both negative p53 regulators⁴⁵, or by down-regulating the expression level of the p14 alternate reading frame (p14^{ARF})⁴⁶.

PRL-3 interacts with the telomere-related protein RAP1, a protein that ensures telomere lengthening, and therefore regulates NF- κ B signaling pathway, by up-regulating the expression and phosphorylation of p65⁴⁷. PRL-3 also promotes cell proliferation by up-regulating KCNN4 channels, in an NF- κ B dependent manner, hence facilitates the G2/M transition⁴⁸. A study conducted in triple-negative breast cancer (TNBC) demonstrated that PRL-3 knockdown results in G1 cell arrest, and induces a TNF α response, which leads to cell senescence, through TNF-R1-mediated activation of NF- κ B, and subsequently apoptosis as a result of increased TNF-R1 signaling through the TNF α -associated extrinsic death pathway, shunting the signaling away from the NF- κ B cascade⁴⁹.

In mouse embryonic fibroblasts (MEFs), PRL-3 overexpression induces G1 arrest downstream of p53, by triggering a PI3K-Akt-activated negative feedback loop⁴⁴. PRL-3 has also been shown to promote proliferation by activating the Akt/mTOR pathway⁵⁰. Akt/mTOR signalling regulates apoptosis, cell growth, cell cycle and angiogenesis. PRL-3 is able to induce mTOR phosphorylation leading to increased downstream signalling of mTOR substrates, such as p70S6K and 4E-BP1⁵¹. A recent study also highlight a cooperation between AKT/mTOR and WNT/ β -catenin signalling networks in PRL-3 high acute myeloid leukemia (AML)⁵².

Furthermore, down-regulation of PRL-3 leads to the inhibition of proliferation and apoptosis induced by emodin in the SGC-7901 human gastric carcinoma cell line⁵³. It was also shown that PRL-3 induces hyperactivation of EGFR and its downstream signaling cascades in multiple human cancer

cell lines⁵⁴. Finally, PRL-3 overexpression in multiple myeloma (MM) increased survival, STAT3 phosphorylation and the number of cells in G2/M and reduced cells in S and G1 phases⁵⁵. Remarkably, in colon cancer, the increase of STAT3 phosphorylation by PRL-3 induces the expression of miR-21, miR-17 and miR-19a, which directly targeted PTEN⁵⁶.

All of these results indicate that PRL-3 is involved in cell-cycle regulation, by controlling phase transition and in the regulation of the major player p53 to promote proliferation and inhibit apoptosis (Figure 1A).

PRL-3 signalling in angiogenesis

Guo *et al.* provided the first evidences about the role of PRL-3 in tumor angiogenesis in 2006. They observed that PRL-3 is expressed in fetal heart, developing blood vessels and immature erythrocytes but not in their mature counterparts suggesting an essential role of PRL-3 in early angiogenic events. Then, they investigated the functions of PRL-3 in tumor angiogenesis, they showed that Chinese hamster ovary (CHO) cells and DLD-1 human colon cancer cells expressing PRL-3 could redirect the migration of human umbilical vascular endothelial cells (HUVEC) toward them, but also that DLD-1 cells could enhance HUVEC vascular formation⁵⁷. Furthermore, after injection of CHO cells expressing PRL-3 into nude mice they observed the recruitment of host endothelial cells into the tumors and initiation of angiogenesis. Interestingly, they reported that PRL-3-expressing cells reduced interleukin-4 (IL-4) expression levels and thus attenuated IL-4 inhibitory effects on the HUVEC vasculature⁵⁷. VEGF is also able to promote PRL-3 gene transcription by inducing the expression of the transcription factor MEF2C⁵⁸.

An additional study showed that PRL-3 participates in VEGF signalling, potentially via Src activation, and enables angiogenesis in primary cultures of murine and human endothelium⁵⁹. Finally, in endometrial adenocarcinoma, PRL-3 induces microvascular vessel formation by promoting VEGF expression via the up-regulation of phosphorylated extracellular signal-regulated kinase (pERK)⁶⁰. The same observations were also obtained in lung cancer cells²⁴ (Figure 1B).

PRL-3 signalling in adhesion

Several studies showed that PRL-3 promotes cancer invasion and metastasis by regulating cell adhesion. Peng *et al.* were the first to identify integrin α 1 as an interacting protein of PRL-3⁶¹ by co-immunoprecipitation assays. After, it was demonstrated that PRL-3 interact and down-regulates the tyrosine-phosphorylation level of integrin β 1^{18,62}, particularly the Y783, a key residue for integrin β 1 function⁶³. PRL-3 also regulates integrin α 2 by suppressing c-fos expression and decreases expression and phosphorylation of paxillin in ovarian cancer cells⁶⁴. The down-regulation of paxillin by PRL-3 was also reported in HeLa cells⁶⁵. In addition, PRL-3 regulates integrin α 5 recycling through Arf1 activity⁶⁶. JAM2, a junctional adhesion molecule, was recently found as PRL-3 interacting protein in colon cancer⁶⁷. To support these observations, in acute lymphoblastic leukemia PRL-3 was shown as a mediator of SDF-1 α stimulated calcium release that leads to activation focal adhesion kinase (FAK) and Src, important effectors of migration and adhesion⁶⁸. Finally, PRL-3 is also able to dephosphorylate phosphatidylinositol⁶⁹ and to increase the phosphorylation level of Erk1/2⁷⁰ (Figure 2A).

PRL-3 signalling in cytoskeleton remodelling

Even though PRL-3 substrates are not completely characterized, there are currently three cytoskeletal proteins that have been identified as PRL-3 targets, providing strong evidence of PRL-3 role promoting migration and invasion by cytoskeleton remodelling.

The first PRL-3 identified substrate was Ezrin. Ezrin belongs to the ERM protein family, which links cell surface receptors and actin cytoskeleton. PRL-3 decreases Ezrin phosphorylation and *in vitro* phosphatase assays suggested that PRL-3 affects Ezrin-pThr567 in endothelial cells, which promotes tumor progression⁷¹.

The cytoskeletal intermediate filament keratin 8 (KRT8), was also identified as a PRL-3 substrate. In fact, there is a physical interaction between PRL-3 and KRT8 and their colocalization at cellular lamellipodias and ruffles *in vivo*. Moreover, PRL-3 expression results in reduced or suppressed KRT8 phosphorylation, particularly at the invasive front and in the liver metastases, indicating that PRL-3 might participate in cell migration and metastasis in colon carcinoma via KRT8 dephosphorylation⁷².

Finally, Stathmin, a key oncoprotein, is also a cytoskeletal PRL-3 associated protein. Stathmin is involved in the control of microtubule dynamics, it interacts with PRL-3 in colon cancer cells, which leads to microtubule destabilization and contributes to progression and metastasis of CRC⁷³.

Other studies have shown that PRL-3 is able to modulate cytoskeleton by regulating Rho family GTPases. In SW480 colorectal carcinoma cells expressing exogenous PRL-1 and PRL-3, an activation of RhoA, RhoC and consequent PRL-mediated motility and invasion were blocked by inhibition of Rho kinase (ROCK), a key Rho effector. Furthermore, PRL PTPs reduced the activity of Rac but did not affect Cdc42 activity¹⁶. PRL-3 also increases RhoA and mDia1 activity in lung cancer, which promotes actin polymerization and leads to increased migration and invasion⁶⁵.

The activation of RhoC by PRL-3 was confirmed by additional studies^{74,75}, showing that in CHO cells expressing PRL-3, reduced level of active RhoA and Rac1 were observed. That coincided with a reduction of actin filaments⁶⁵. The effects of PRL-3 on RhoA and probably on the other Rho GTPases, might be cell type dependent or fluctuate according to the biological context (Figure 2B).

PRL-3 signalling in EMT and motility

PRL-3 also plays a critical role in epithelial to mesenchymal transition (EMT). EMT is a physiological process required during development for tissues and organs formation. It has been shown that PRL-3 is required in *Xenopus laevis* for cephalic neural crest migration *in vivo*, essential for embryonic development,⁷⁶. The same EMT mechanisms is guiding the transformation of epithelia cells into mesenchymal phenotype in cancer, enabling their migration and a form of metastasis. In cancer cells, it has been well described that PRL-3 is able to initiate EMT by activating Akt pathway. Wang *et al.* reported for the first time in 2007 that PRL-3 activates Akt by down-regulating PTEN expression, inhibiting GSK-3 β , which leads to increase in mesenchymal markers, as fibronectin and Snail and the reduction of epithelial markers, as E-cadherin, γ -catenin and integrin β 3⁶⁵. The activation of Akt pathway by PRL-3 was then confirmed also by others^{50,77-80}. It was also demonstrated that PRL-3 promotes EMT by directly down-regulating E-cadherin and CDH22 expression^{81,82}. Another study showed that PRL-3 is able to down-regulate PTEN by NHERF1 dephosphorylation in the nucleus, leading to the translocation of both PTEN and NHERF1 from the nucleus to the cytoplasm⁸³. Moreover, in colon cancer cells, PRL-3 induces KCNN4 expression, resulting in Snail expression and parallel reduction of E-cadherin⁸⁴.

Finally, a study performed in acute myelogenous leukemia shows that LEO1 expression, a component of RNA polymerase II-associated factor (PAF), activates SOX2 and SOX4 gene expression which are potent oncogenes in myeloid transformation. These molecular regulations positively correlated with PRL-3 levels⁸⁵ again confirming a role of PRL-3 in EMT and motility in cancer (Figure 3A).

PRL-3 signalling in invasion

The link between PRL-3 and the tyrosine kinase Src, a well-known proto-oncogene, seems to be fundamental in the promotion of invasion and metastasis. PRL-3 is able to promote cell invasion by activating Src⁸⁶, as well as Src is also able to promote invasion and motility by mediating PRL-3 phosphorylation⁷⁴, showing mutual dependence between these two players. PRL-3 induces Src activation by increasing eIF2 phosphorylation, which down-regulate Csk, a negative Src regulator⁸⁷. Furthermore, to clarify the PRL3-mediated signalling network, Walls *et al.* showed that PRL-3 expressing cells exhibit an increase in protein tyrosine phosphorylation in general, but especially on a multiple signalling effectors responsible for Rho-family GTPase, PI3K-Akt, STAT, and ERK activation, suggesting Src as the primary signal transducer of PRL-3 effects⁸⁸.

In addition, some studies also highlighted that PRL-3 facilitates tumor cells invasion by regulating extracellular matrix degradation mediated by matrix metalloproteinases (MMPs). In particular, PRL-3 has been demonstrated to promote invasion by up-regulating MMP-10⁸⁹ in TNBC cells, MMP-7 in human colorectal cancer⁹⁰ and in glioblastoma⁹¹. Likewise, PRL-3 up-regulates MMP-7⁷⁰ as well as MMP-2/MMP-9 in gastric carcinoma⁷⁷. It was observed in colon cancer cells that PRL-3 promotes MMP-2 activity by regulating the balance between MMP-2 and TIMP2 (MMP-2 endogenous inhibitor)⁶². PRL-3 also increases cell membrane accumulation and activity of MMP-14 in uveal melanoma⁹².

Finally, a recent study reported another mechanism by which PRL-3 can promote invasion in colorectal cancer. According to this study, PRL-3 up-regulates CCL26 that binds to the CCR3 receptor, and induces mobilization of intracellular Ca²⁺ in TAMs, resulting in increased expression of IL-6 and IL-8 and therefore tumor-associated macrophages (TAM) infiltration (see figure 3B)⁹³. Yet, TAMs play a role in invasion, as they are present in inflammatory infiltrates in tumor tissues and they can produce numerous lymphangiogenic growth factors, cytokines, proteases which are mediators promoting tumor cell proliferation and metastasis⁹⁴.

Discussion

As described in the previous sections, PRL-3 is able to modulate the key processes that lead to metastasis. This is achieved mainly by targeting major signaling pathways, such as p53, MAPK, mTOR and STAT3, thus promoting proliferation and survival. PRL-3 induces angiogenesis via VEGF activation (Figure 4). A strong correlation between PRL-3 and Erk was shown, Erk is well known to allow extracellular matrix adhesion. Even though the role of PRL-3 on RhoGTPase is not clear (in some studies PRL-3 activates RhoA and in other the phosphatase down-regulates RhoA expression), PRL-3 modulates RhoGTPase to promote cytoskeleton remodeling but also EMT and motility, invasion and angiogenesis. The activation of AKT by PRL-3 is also well established and it promotes survival, EMT and motility, and invasion. Finally, one of the most important players activated by PRL-3 is the kinase Src to promote invasion and metastasis. PRL-3 also acts by regulating some effectors directly. Indeed, the phosphatase regulates directly integrins, FAK and paxillin involved in focal adhesions or MMPs involved in the degradation of extracellular matrix (Figure 4). PRL-3 also modulates cytoskeleton proteins such as Ezrin, stathmin and keratin 8 which each of them regulating actin, microtubules and intermediate filaments respectively.

As PRL-3 is involved in many cancers, this phosphatase appears to be a viable therapeutic target. Some PTP inhibitors are currently used in research but some efforts must be done in order to obtain a selective component that can be used in therapy. Numerous molecules were identified to inhibit PRL-3 by using different mechanisms. Some of them inhibit the phosphatase activity of PRL-3. However, it is also possible to inhibit its anchorage to the plasma membrane by inhibiting farnesylation. Certainly, PRL-3 localization may regulate its function. For example, it was shown that

preventing PRL-3 anchorage to the plasma membrane, using farnesyl-transferases inhibitors (FTI), abolishes PRL-3-induced migration in cells¹². Unfortunately, most of the studies did not mention the localization or the state (phosphorylated, prenylated) of PRL-3, so that we cannot determine if these parameters are crucial for all of its functions.

The information about the signalling of PRL-3 in cancer invasion is now presented in a form of signalling map and available online. The PRL-3 map is part of the Atlas of Cancer Signalling Network (ACSN, <https://acsn.curie.fr/Temp/ACSN2.html>)⁹⁵, the map is entitled 'The invasion and motility map'. ACSN is a web-based resource that contains a collection of maps depicting molecular processes in the cancer cell as well as in the tumor microenvironment. This tool has many applications that have been reviewed elsewhere⁹⁶. This systems biology approach of knowledge representation allows to analyse omics data in the context of the map in order to understand implication of PRL-3-regulated processes in different cancer types. ACSN also forms part of the disease maps community (<http://disease-maps.org>), which aims to apply similar approaches to study different diseases. This partnership allows the study of disease comorbidities, treatment responses prediction, among others^{97,98}. This integration with other resources opens further opportunity to reveal role of PRL-3-related signalling in human disease different from cancer.

Authors contribution

LD, reviewed the literature, constructed signalling network map and wrote the paper. LCMG, performed structural analysis of the signalling network map, created reduced models and wrote the paper. IK, supervised the systems biology part and coordinated the paper writing. SS, leded the PRL-3-related project, advised during the paper writing and critically revised the text.

Acknowledgements

This work has been supported by the COLOSYS grant ANR-15-CMED-0001-04, provided by the Agence Nationale de la Recherche under the frame of ERACoSysMed-1, the ERA-Net for Systems Medicine in clinical research and medical practice, by PRECISE H2020 EU grant and by retina France grant. This work received support from MASTODON program by CNRS (project APLIGOOGLLE).

Conflicts of interest

The authors have no potential conflicts of interest

References

1. Hanahan, D., Weinberg, R. a & Francisco, S. The Hallmarks of Cancer Review University of California at San Francisco. **100**, 57–70 (2000).
2. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell* **144**, 646–674 (2011).
3. Friedl, P. & Wolf, K. Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms. *Nat. Rev. Cancer* **3**, 362–74 (2003).
4. Alonso, A. *et al.* Protein Tyrosine Phosphatases in the Human Genome. *Cell* **117**, 699–711 (2004).
5. Östman, A., Hellberg, C. & Böhmer, F. D. Protein-tyrosine phosphatases and cancer. *Nat. Rev. Cancer* **6**, 307–320 (2006).
6. Rios, P., Li, X. & Köhn, M. Molecular mechanisms of the PRL phosphatases. *FEBS J.*

- 280**, 505–24 (2013).
7. Lin, M.-D. *et al.* Expression of phosphatase of regenerating liver family genes during embryogenesis: an evolutionary developmental analysis among *Drosophila*, amphioxus, and zebrafish. *BMC Dev. Biol.* **13**, 18 (2013).
 8. Zeng, Q., Hong, W. & Tan, Y. H. Mouse PRL-2 and PRL-3, Two Potentially Prenylated Protein Tyrosine Phosphatases Homologous to PRL-1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **244**, 421–427 (1998).
 9. Bessette, D. C., Qiu, D. & Pallen, C. J. PRL PTPs: mediators and markers of cancer progression. *Cancer Metastasis Rev.* **27**, 231–52 (2008).
 10. Cates, C. A. *et al.* Prenylation of oncogenic human PTPcaax protein tyrosine phosphatases. *Cancer Lett.* **110**, 49–55 (1996).
 11. Zeng, Q. *et al.* Prenylation-dependent Association of Protein-tyrosine Phosphatases PRL-1, -2, and -3 with the Plasma Membrane and the Early Endosome. *J. Biol. Chem.* **275**, 21444–21452 (2000).
 12. Diamond, R. H., Cressman, D. E., Laz, T. M., Abrams, C. S. & Taub, R. PRL-1, a unique nuclear protein tyrosine phosphatase, affects cell growth. *Mol. Cell. Biol.* **14**, 3752–62 (1994).
 13. Fagerli, U.-M. *et al.* Overexpression and involvement in migration by the metastasis-associated phosphatase PRL-3 in human myeloma cells. *Blood* **111**, 806–815 (2008).
 14. Matter, W. F. *et al.* Role of PRL-3, a human muscle-specific tyrosine phosphatase, in angiotensin-II signaling. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **283**, 1061–8 (2001).
 15. Sun, J.-P. *et al.* Phosphatase Activity, Trimerization, and the C-terminal Polybasic Region Are All Required for PRL1-mediated Cell Growth and Migration. *J. Biol. Chem.* **282**, 29043–29051 (2007).
 16. Fiordalisi, J. J., Keller, P. J. & Cox, A. D. PRL tyrosine phosphatases regulate rho family GTPases to promote invasion and motility. *Cancer Res.* **66**, 3153–61 (2006).
 17. Song, R. *et al.* Phosphatase of Regenerating Liver-3 Localizes to Cyto-Membrane and Is Required for B16F1 Melanoma Cell Metastasis In Vitro and In Vivo. *PLoS One* **4**, e4450 (2009).
 18. Foy, M., Anézo, O., Saule, S. & Planque, N. PRL-3 / PTP4A3 phosphatase regulates integrin β 1 in adhesion structures during migration of human ocular melanoma cells. *Exp. Cell Res.* **353**, 88–99 (2017).
 19. Saha, S. A Phosphatase Associated with Metastasis of Colorectal Cancer. *Science* (80-). **294**, 1343–1346 (2001).
 20. Miskad, U. A. *et al.* High PRL-3 expression in human gastric cancer is a marker of metastasis and grades of malignancies: an in situ hybridization study. *Virchows Arch.* **450**, 303–310 (2007).
 21. Polato, F. *et al.* PRL-3 phosphatase is implicated in ovarian cancer growth. *Clin. Cancer Res.* **11**, 6835–9 (2005).
 22. Ren, T. *et al.* Prognostic Significance of Phosphatase of Regenerating Liver-3 Expression in Ovarian Cancer. *Pathol. Oncol. Res.* **15**, 555–560 (2009).
 23. Ma, Y. & Li, B. Expression of phosphatase of regenerating liver-3 in squamous cell carcinoma of the cervix. *Med. Oncol.* **28**, 775–780 (2011).
 24. Ming, J., Liu, N., Gu, Y., Qiu, X. & Wang, E.-H. PRL-3 facilitates angiogenesis and metastasis by increasing ERK phosphorylation and up-regulating the levels and activities of Rho-A/C in lung cancer. *Pathology* **41**, 118–26 (2009).
 25. Xu, Y. *et al.* Expression and Prognostic Value of PRL-3 in Human Intrahepatic

- Cholangiocarcinoma. *Pathol. Oncol. Res.* **16**, 169–175 (2010).
26. Zhao, W.-B., Li, Y., Liu, X., Zhang, L.-Y. & Wang, X. Evaluation of PRL-3 expression, and its correlation with angiogenesis and invasion in hepatocellular carcinoma. *Int. J. Mol. Med.* **22**, 187–92 (2008).
 27. Kong, L., Li, Q., Wang, L., Liu, Z. & Sun, T. The value and correlation between PRL-3 expression and matrix metalloproteinase activity and expression in human gliomas. *Neuropathology* **27**, 516–521 (2007).
 28. Zhou, J., Wang, S., Lu, J., Li, J. & Ding, Y. Over-expression of phosphatase of regenerating liver-3 correlates with tumor progression and poor prognosis in nasopharyngeal carcinoma. *Int. J. Cancer* **124**, 1879–1886 (2009).
 29. Liu, Y.-Q., Li, H.-X., Lou, X. & Lei, J.-Y. Expression of phosphatase of regenerating liver 1 and 3 mRNA in esophageal squamous cell carcinoma. *Arch. Pathol. Lab. Med.* **132**, 1307–12 (2008).
 30. Buffart, T. E. *et al.* DNA copy number changes at 8q11-24 in metastasized colorectal cancer. *Cell. Oncol.* **27**, 57–65 (2005).
 31. Bardelli, A. *et al.* PRL-3 expression in metastatic cancers. *Clin. Cancer Res.* **9**, 5607–15 (2003).
 32. Radke, I. *et al.* Expression and prognostic impact of the protein tyrosine phosphatases PRL-1, PRL-2 and PRL-3 in breast cancer. *Br. J. Cancer* **95**, 347–354 (2006).
 33. Laurent, C. *et al.* High PTP4A3 phosphatase expression correlates with metastatic risk in uveal melanoma patients. *Cancer Res.* **71**, 666–74 (2011).
 34. Al-Aidaros, A. Q. O. & Zeng, Q. PRL-3 phosphatase and cancer metastasis. *J. Cell. Biochem.* **111**, 1087–1098 (2010).
 35. Dong, Q., Ding, X., Chang, B., Wang, H. & Wang, A. PRL-3 promotes migration and invasion and is associated with poor prognosis in salivary adenoid cystic carcinoma. *J. Oral Pathol. Med.* **45**, 111–8 (2016).
 36. Qu, S. *et al.* Independent oncogenic and therapeutic significance of phosphatase PRL-3 in FLT3-ITD-negative acute myeloid leukemia. *Cancer* **120**, 2130–2141 (2014).
 37. Broyl, A. *et al.* Gene expression profiling for molecular classification of multiple myeloma in newly diagnosed patients. *Blood* **116**, 2543–2553 (2010).
 38. Kitano, H., Funahashi, A., Matsuoka, Y. & Oda, K. Using process diagrams for the graphical representation of biological networks. *Nat. Biotechnol.* **23**, 961–966 (2005).
 39. Novère, N. Le *et al.* The Systems Biology Graphical Notation. *Nat. Biotechnol.* **27**, 735–741 (2009).
 40. Hucka, M. *et al.* The systems biology markup language (SBML): a medium for representation and exchange of biochemical network models. *Bioinformatics* **19**, 524–31 (2003).
 41. Zinovyev, A., Viara, E., Calzone, L. & Barillot, E. BiNoM: a Cytoscape plugin for manipulating and analyzing biological networks. *Bioinformatics* **24**, 876–7 (2008).
 42. Shannon, P. *et al.* Cytoscape: A Software Environment for Integrated Models of Biomolecular Interaction Networks. *Genome Res.* **13**, 2498–2504 (2003).
 43. Vera-Licona, P., Bonnet, E., Barillot, E. & Zinovyev, A. OCSANA: optimal combinations of interventions from network analysis. *Bioinformatics* **29**, 1571–3 (2013).
 44. Basak, S. *et al.* The metastasis-associated gene Prl-3 is a p53 target involved in cell-cycle regulation. *Mol. Cell* **30**, 303–14 (2008).
 45. Min, S.-H. *et al.* Downregulation of p53 by phosphatase of regenerating liver 3 is mediated by MDM2 and PIRH2. *Life Sci.* **86**, 66–72 (2010).

46. Xie, H. & Wang, H. PRL-3 promotes breast cancer progression by downregulating p14ARF-mediated p53 expression. *Oncol. Lett.* **15**, 2795–2800 (2017).
47. Lian, S. *et al.* PRL-3 activates NF- κ B signaling pathway by interacting with RAP1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **430**, 196–201 (2013).
48. Lai, W. *et al.* PRL-3 promotes the proliferation of LoVo cells via the upregulation of KCNN4 channels. *Oncol. Rep.* **26**, 909–17 (2011).
49. Gari, H. H., DeGala, G. D., Lucia, M. S. & Lambert, J. R. Loss of the oncogenic phosphatase PRL-3 promotes a TNF-R1 feedback loop that mediates triple-negative breast cancer growth. *Oncogenesis* **5**, e255 (2016).
50. Wang, L. *et al.* PTP4A3 is a target for inhibition of cell proliferation, migration and invasion through Akt/mTOR signaling pathway in glioblastoma under the regulation of miR-137. *Brain Res.* **1646**, 441–50 (2016).
51. Ye, Z. *et al.* PRL-3 activates mTORC1 in Cancer Progression. *Sci. Rep.* **5**, 17046 (2015).
52. Zhou, J. *et al.* A loss-of-function genetic screening reveals synergistic targeting of AKT/mTOR and WTN/ β -catenin pathways for treatment of AML with high PRL-3 phosphatase. *J. Hematol. Oncol.* **11**, 36 (2018).
53. Sun, Z.-H. & Bu, P. Downregulation of phosphatase of regenerating liver-3 is involved in the inhibition of proliferation and apoptosis induced by emodin in the SGC-7901 human gastric carcinoma cell line. *Exp. Ther. Med.* **3**, 1077–1081 (2012).
54. Al-Aidaros, A. Q. O. *et al.* Metastasis-associated PRL-3 induces EGFR activation and addiction in cancer cells. *J. Clin. Invest.* **123**, 3459–71 (2013).
55. Slørdahl, T. S. *et al.* The phosphatase of regenerating liver-3 (PRL-3) is important for IL-6-mediated survival of myeloma cells. *Oncotarget* **7**, 27295–306 (2016).
56. Zhang, J. *et al.* miR-21, miR-17 and miR-19a induced by phosphatase of regenerating liver-3 promote the proliferation and metastasis of colon cancer. *Br. J. Cancer* **107**, 352–9 (2012).
57. Guo, K. *et al.* PRL-3 initiates tumor angiogenesis by recruiting endothelial cells in vitro and in vivo. *Cancer Res.* **66**, 9625–35 (2006).
58. Xu, J. *et al.* VEGF promotes the transcription of the human PRL-3 gene in HUVEC through transcription factor MEF2C. *PLoS One* **6**, e27165 (2011).
59. Zimmerman, M. W. *et al.* Protein-tyrosine phosphatase 4A3 (PTP4A3) promotes vascular endothelial growth factor signaling and enables endothelial cell motility. *J. Biol. Chem.* **289**, 5904–13 (2014).
60. Ming, J., Jiang, Y., Jiang, G. & Zheng, H. Phosphatase of regenerating liver-3 induces angiogenesis by increasing extracellular signal-regulated kinase phosphorylation in endometrial adenocarcinoma. *Pathobiology* **81**, 1–7 (2014).
61. Peng, L. *et al.* Identification of integrin alpha1 as an interacting protein of protein tyrosine phosphatase PRL-3. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **342**, 179–83 (2006).
62. Peng, L. *et al.* PRL-3 promotes the motility, invasion, and metastasis of LoVo colon cancer cells through PRL-3-integrin beta1-ERK1/2 and-MMP2 signaling. *Mol. Cancer* **8**, 110 (2009).
63. Tian, W. *et al.* Phosphatase of regenerating liver-3 directly interacts with integrin β 1 and regulates its phosphorylation at tyrosine 783. *BMC Biochem.* **13**, 22 (2012).
64. Liu, H. *et al.* PRL-3 suppresses c-Fos and integrin α 2 expression in ovarian cancer cells. *BMC Cancer* **13**, 80 (2013).
65. Wang, H. *et al.* PRL-3 down-regulates PTEN expression and signals through PI3K to promote epithelial-mesenchymal transition. *Cancer Res.* **67**, 2922–6 (2007).

66. Krndija, D. *et al.* The phosphatase of regenerating liver 3 (PRL-3) promotes cell migration through Arf-activity-dependent stimulation of integrin $\alpha 5$ recycling. *J. Cell Sci.* **125**, 3883–92 (2012).
67. Lian, S. *et al.* PRL-3 promotes cell adhesion by interacting with JAM2 in colon cancer. *Oncol. Lett.* **12**, 1661–1666 (2016).
68. Hjort, M. A. *et al.* Phosphatase of regenerating liver-3 is expressed in acute lymphoblastic leukemia and mediates leukemic cell adhesion, migration and drug resistance. (2017). at <www.impactjournals.com/oncotarget>
69. McParland, V. *et al.* The metastasis-promoting phosphatase PRL-3 shows activity toward phosphoinositides. *Biochemistry* **50**, 7579–90 (2011).
70. Cao, Y. *et al.* RNAi-mediated knockdown of PRL-3 inhibits cell invasion and downregulates ERK 1/2 expression in the human gastric cancer cell line, SGC-7901. *Mol. Med. Rep.* **7**, 1805–11 (2013).
71. Forte, E. *et al.* Ezrin is a specific and direct target of protein tyrosine phosphatase PRL-3. *Biochim. Biophys. Acta* **1783**, 334–44 (2008).
72. Mizuuchi, E., Semba, S., Kodama, Y. & Yokozaki, H. Down-modulation of keratin 8 phosphorylation levels by PRL-3 contributes to colorectal carcinoma progression. *Int. J. Cancer* **124**, 1802–10 (2009).
73. Zheng, P. *et al.* Stathmin, a new target of PRL-3 identified by proteomic methods, plays a key role in progression and metastasis of colorectal cancer. *J. Proteome Res.* **9**, 4897–905 (2010).
74. Fiordalisi, J. J., Dewar, B. J., Graves, L. M., Madigan, J. P. & Cox, A. D. Src-mediated phosphorylation of the tyrosine phosphatase PRL-3 is required for PRL-3 promotion of Rho activation, motility and invasion. *PLoS One* **8**, e64309 (2013).
75. ZHANG, P. *et al.* Expression and it's Relationship of PRL-3 and RhoC in Non-small Cell Lung Cancer. *Chinese J. Lung Cancer* **13**, 598–601 (2010).
76. Maacha, S. *et al.* Protein tyrosine phosphatase 4A3 (PTP4A3) is required for *Xenopus laevis* cranial neural crest migration in vivo. *PLoS One* **8**, e84717 (2013).
77. Xiong, J. *et al.* PRL-3 promotes the peritoneal metastasis of gastric cancer through the PI3K/Akt signaling pathway by regulating PTEN. *Oncol. Rep.* **36**, 1819–28 (2016).
78. Ren, S. *et al.* PRL-3 Is Involved in Estrogen- and IL-6-Induced Migration of Endometrial Stromal Cells From Ectopic Endometrium. *Reprod. Sci.* (2016). doi:10.1177/1933719116650751
79. Jiang, Y. *et al.* Phosphatase PRL-3 is a direct regulatory target of TGFbeta in colon cancer metastasis. *Cancer Res.* **71**, 234–44 (2011).
80. Huang, Y.-H. *et al.* A role of autophagy in PTP4A3-driven cancer progression. *Autophagy* **10**, 1–14 (2014).
81. Liu, Y. *et al.* PRL-3 promotes epithelial mesenchymal transition by regulating cadherin directly. *Cancer Biol. Ther.* **8**, 1352–9 (2009).
82. Pryczynicz, A., Guzińska-Ustymowicz, K., Niewiarowska, K., Cepowicz, D. & Kemonia, A. PRL-3 and E-cadherin show mutual interactions and participate in lymph node metastasis formation in gastric cancer. *Tumour Biol.* **35**, 6587–92 (2014).
83. Fang, X.-Y. *et al.* PRL-3 Promotes the Malignant Progression of Melanoma via Triggering Dephosphorylation and Cytoplasmic Localization of NHERF1. *J. Invest. Dermatol.* **135**, 2273–82 (2015).
84. Lai, W. *et al.* KCNN4 channels participate in the EMT induced by PRL-3 in colorectal cancer. *Med. Oncol.* **30**, 566 (2013).

85. Chong, P. S. Y. *et al.* LEO1 is regulated by PRL-3 and mediates its oncogenic properties in acute myelogenous leukemia. *Cancer Res.* **74**, 3043–53 (2014).
86. Liang, F. *et al.* PRL3 promotes cell invasion and proliferation by down-regulation of Csk leading to Src activation. *J. Biol. Chem.* **282**, 5413–9 (2007).
87. Liang, F. *et al.* Translational control of C-terminal Src kinase (Csk) expression by PRL3 phosphatase. *J. Biol. Chem.* **283**, 10339–46 (2008).
88. Walls, C. D. *et al.* Phosphatase of Regenerating Liver 3 (PRL3) Provokes a Tyrosine Phosphoproteome to Drive Prometastatic Signal Transduction. *Mol. Cell. Proteomics* **12**, 3759–3777 (2013).
89. Gari, H. H., DeGala, G. D., Ray, R., Lucia, M. S. & Lambert, J. R. PRL-3 engages the focal adhesion pathway in triple-negative breast cancer cells to alter actin structure and substrate adhesion properties critical for cell migration and invasion. *Cancer Lett.* **380**, 505–512 (2016).
90. Lee, S.-K. *et al.* Phosphatase of regenerating liver-3 promotes migration and invasion by upregulating matrix metalloproteinases-7 in human colorectal cancer cells. *Int. J. Cancer* **131**, E190-203 (2012).
91. Mu, N. *et al.* PRL-3 is a potential glioblastoma prognostic marker and promotes glioblastoma progression by enhancing MMP7 through the ERK and JNK pathways. *Theranostics* **8**, 1527–1539 (2018).
92. Maacha, S. *et al.* Protein tyrosine phosphatase 4A3 (PTP4A3) promotes human uveal melanoma aggressiveness through membrane accumulation of matrix metalloproteinase 14 (MMP14). *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* **57**, 1982–1990 (2016).
93. Lan, Q. *et al.* CCL26 Participates in the PRL-3-Induced Promotion of Colorectal Cancer Invasion by Stimulating Tumor-Associated Macrophage Infiltration. *Mol. Cancer Ther.* **17**, 276–289 (2018).
94. Sica, A. & Bronte, V. Altered macrophage differentiation and immune dysfunction in tumor development. *J. Clin. Invest.* **117**, 1155–66 (2007).
95. Kuperstein, I. *et al.* Atlas of Cancer Signalling Network: a systems biology resource for integrative analysis of cancer data with Google Maps. *Oncogenesis* **4**, e160 (2015).
96. Monraz Gomez, L. C. *et al.* Application of Atlas of Cancer Signalling Network in preclinical studies. *Brief. Bioinform.* (2018). doi:10.1093/bib/bby031
97. Mazein, A. *et al.* Systems medicine disease maps: community-driven comprehensive representation of disease mechanisms. *npj Syst. Biol. Appl.* **4**, 21 (2018).
98. Ostaszewski, M. *et al.* Community-driven roadmap for integrated disease maps. *Brief. Bioinform.* (2018). doi:10.1093/bib/bby024

Figure legends

Figure 1. A: Molecular mechanisms induced by PRL-3 leading to cell cycle progression, survival and proliferation in cancer. B: Molecular mechanisms leading to angiogenesis induced by PRL-3 in cancer.

Figure 2. A: Molecular mechanisms of cell matrix adhesion induced by PRL-3 in cancer. B: Molecular mechanism of cytoskeleton remodelling induced by PRL-3 in cancer. For the entities annotation please see the legend in Figure 1.

Figure 3. A: Molecular mechanisms leading to EMT and motility induced by PRL-3 in cancer. B: Molecular mechanisms that promote invasion induced by PRL-3 in cancer. For the entities annotation please see the legend in Figure 1.

Figure 4. Main players and signalling pathways regulated by PRL-3 in the key step processes of tumorigenesis and metastasis development.

Supplementary figure

Supplementary Figure 1. Literature based network map of PRL-3 involvement in cancer. The network was manually constructed in CellDesigner. It covers 117 proteins, represents 364 reactions and is based on 63 scientific papers.

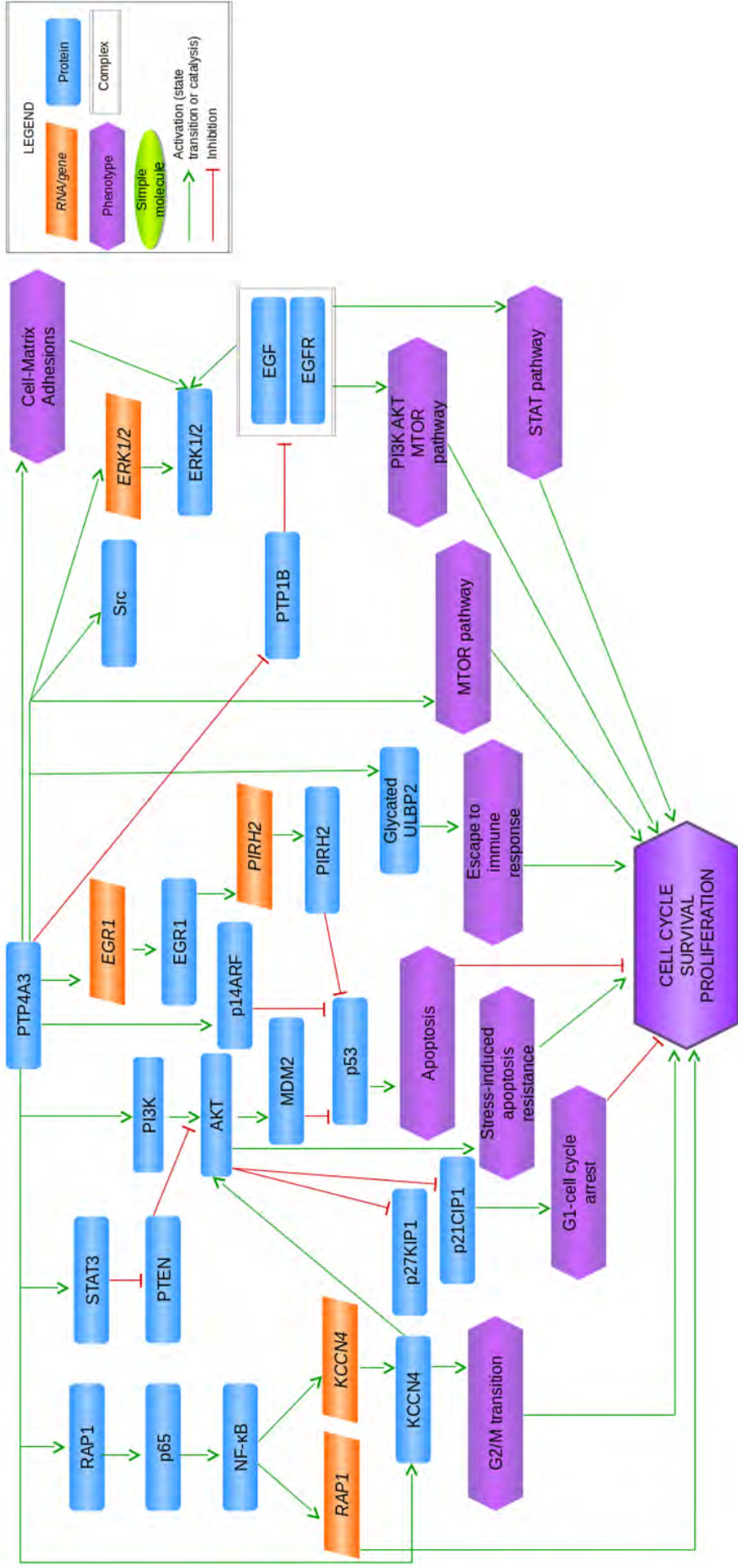


Figure 1. A: Molecular mechanisms induced by PRL-3 leading to cell cycle progression, survival and proliferation in cancer.

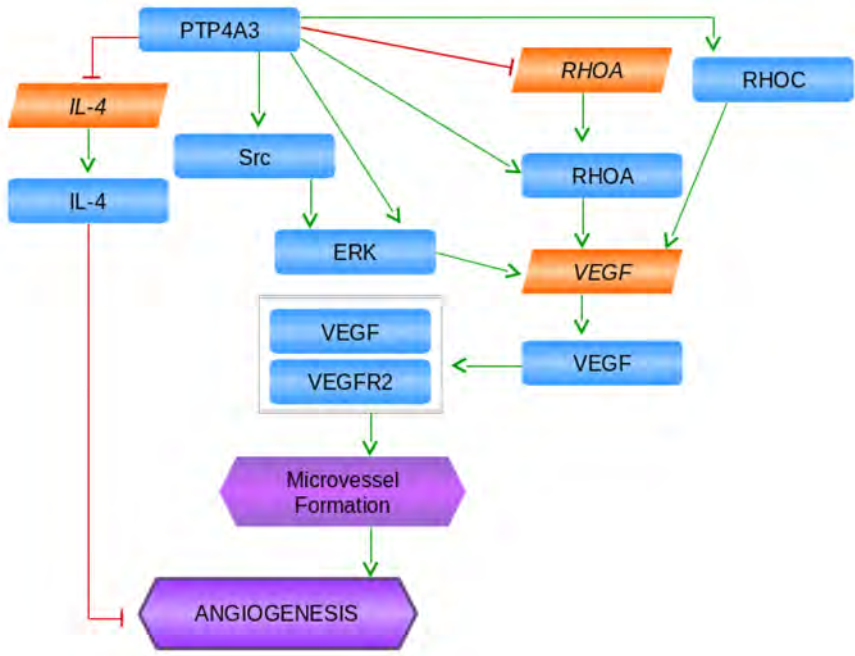


Figure 1. B: Molecular mechanisms leading to angiogenesis induced by PRL-3 in cancer.

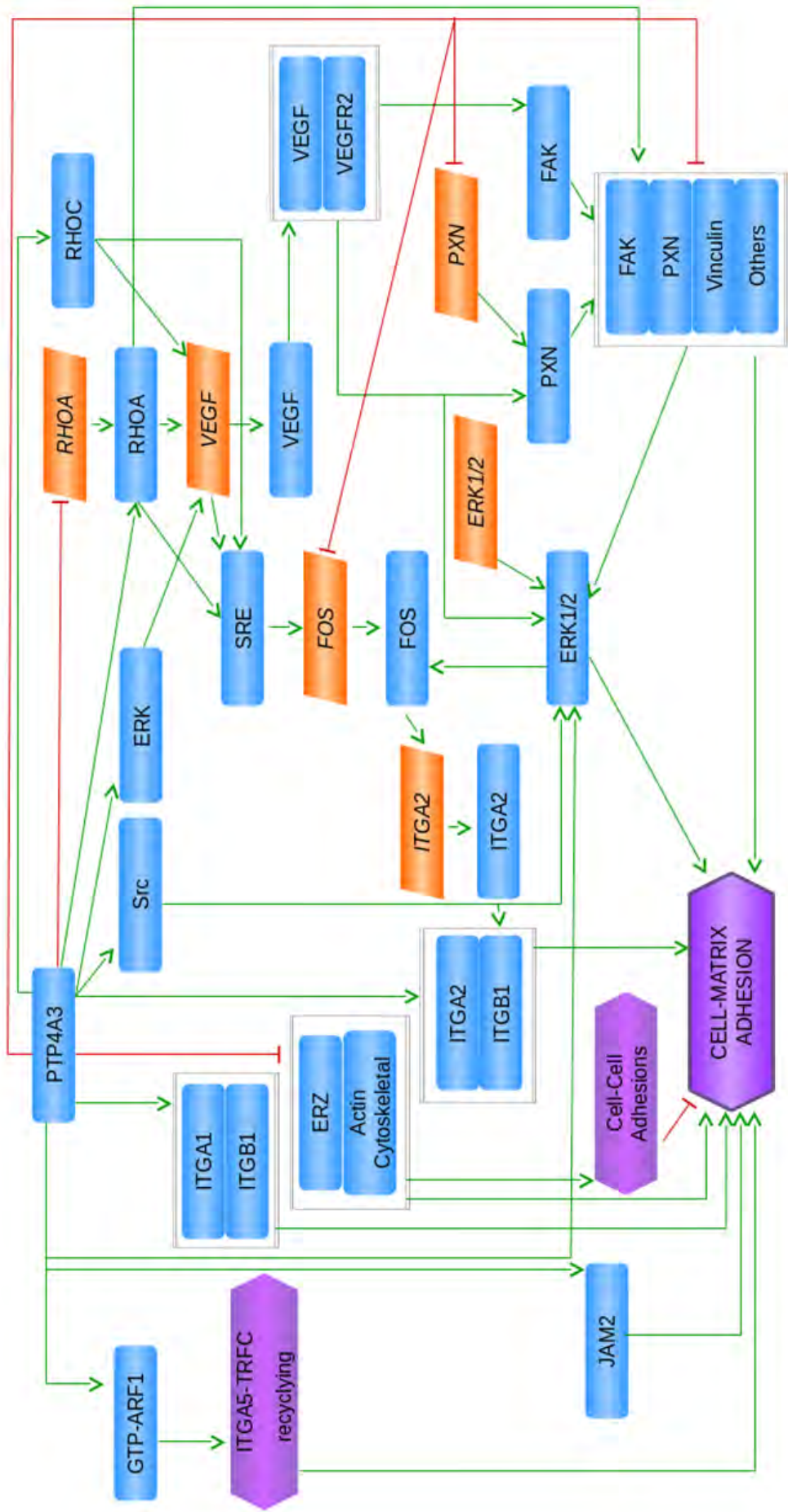


Figure 2. A: Molecular mechanisms of cell matrix adhesion induced by PRL-3 in cancer.

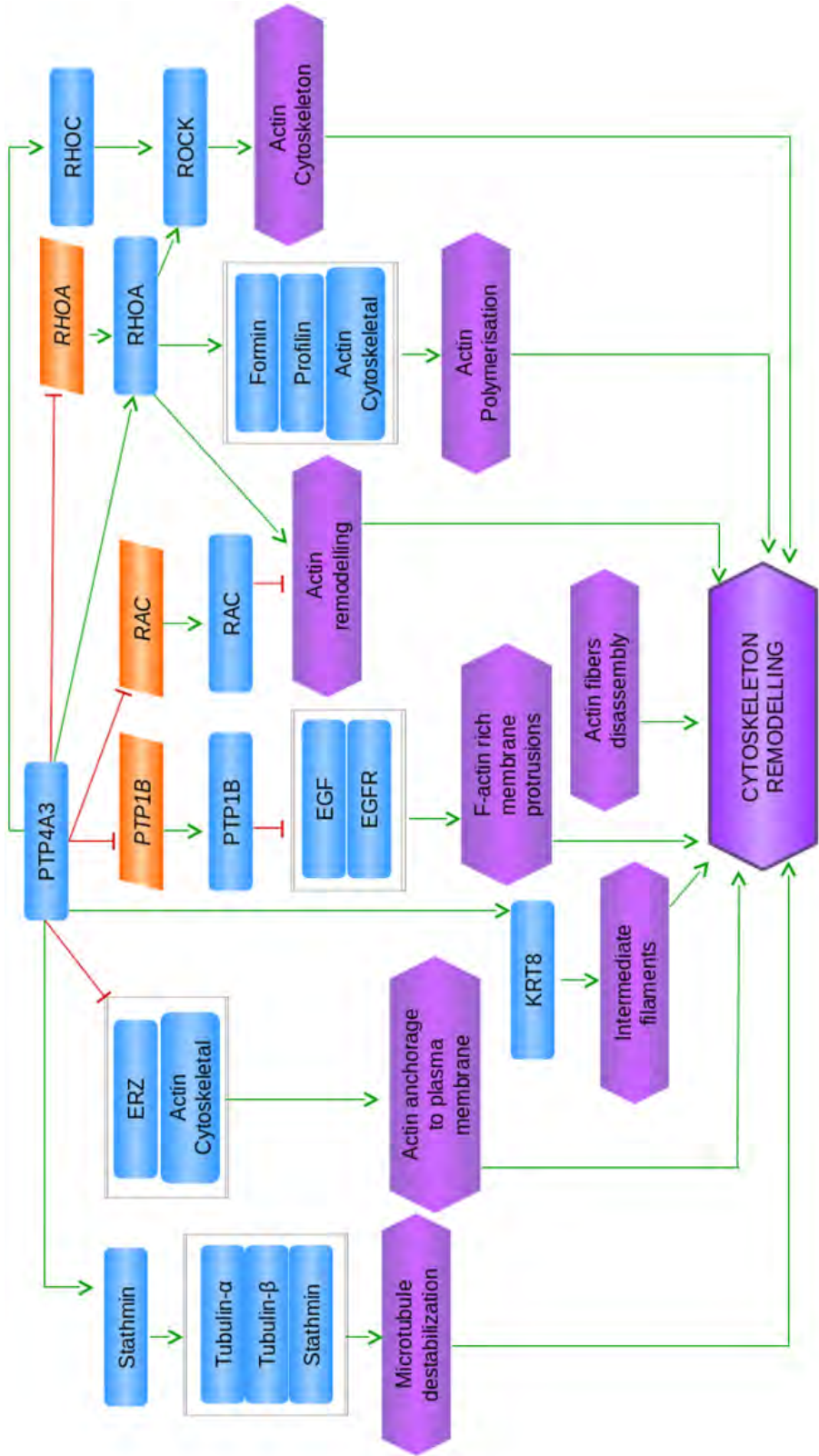


Figure 2. B: Molecular mechanism of cytoskeleton remodelling induced by PRL-3 in cancer. For the entities annotation please see the legend in Figure 1.

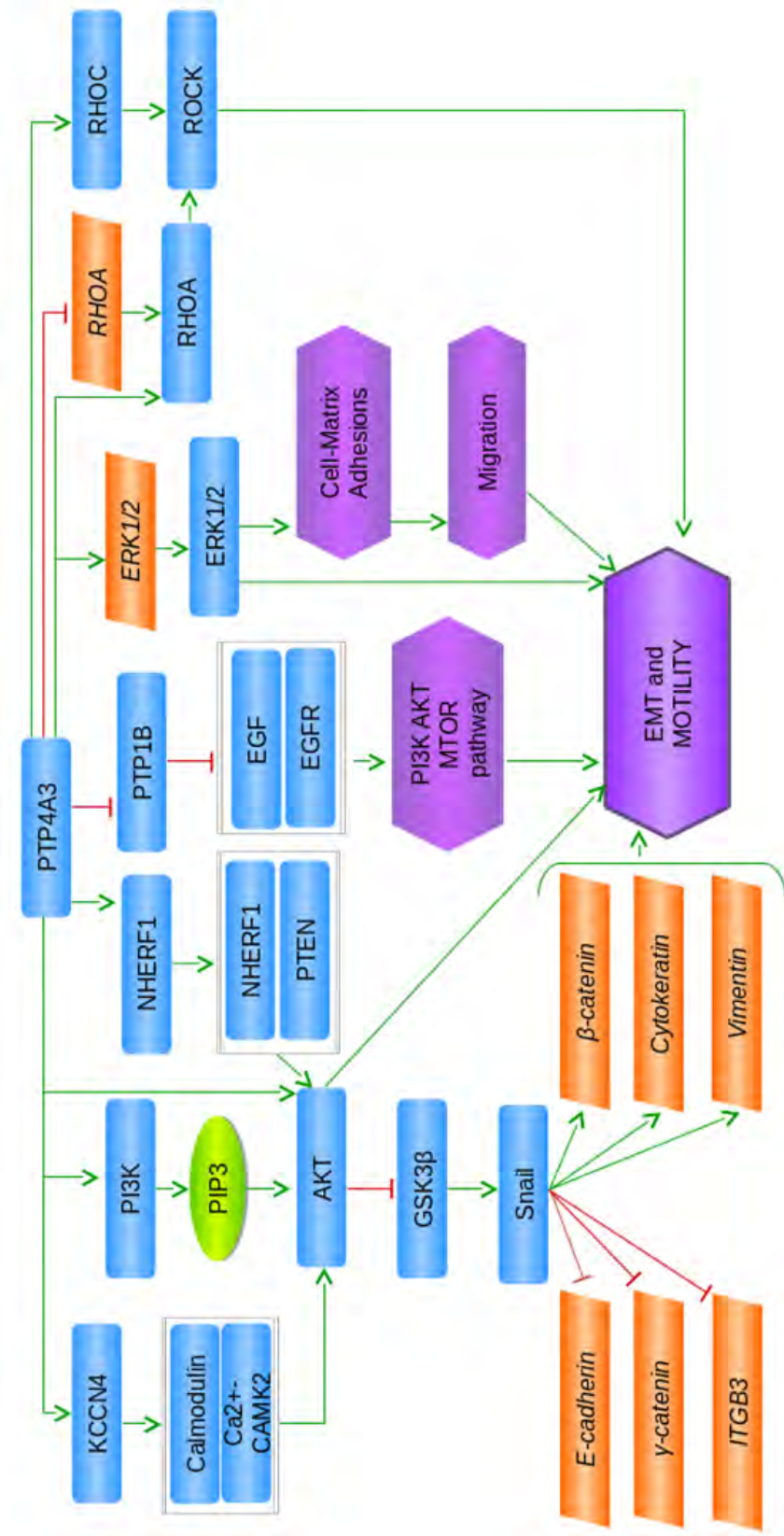


Figure 3. A: Molecular mechanisms leading to EMT and motility induced by PRL-3 in cancer.

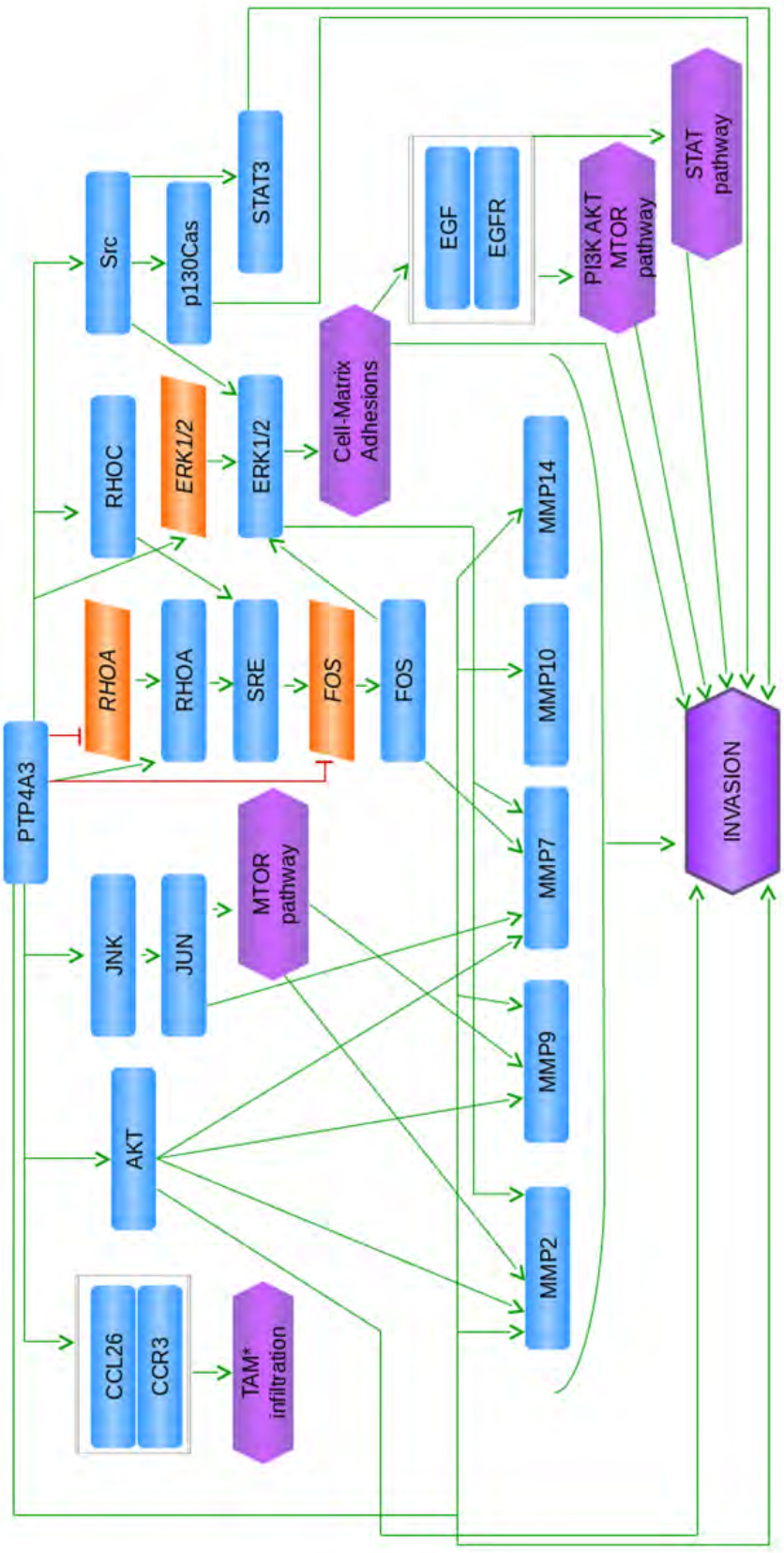


Figure 3. B: Molecular mechanisms that promote invasion induced by PRL-3 in cancer. For the entities annotation please see the legend in Figure 1.

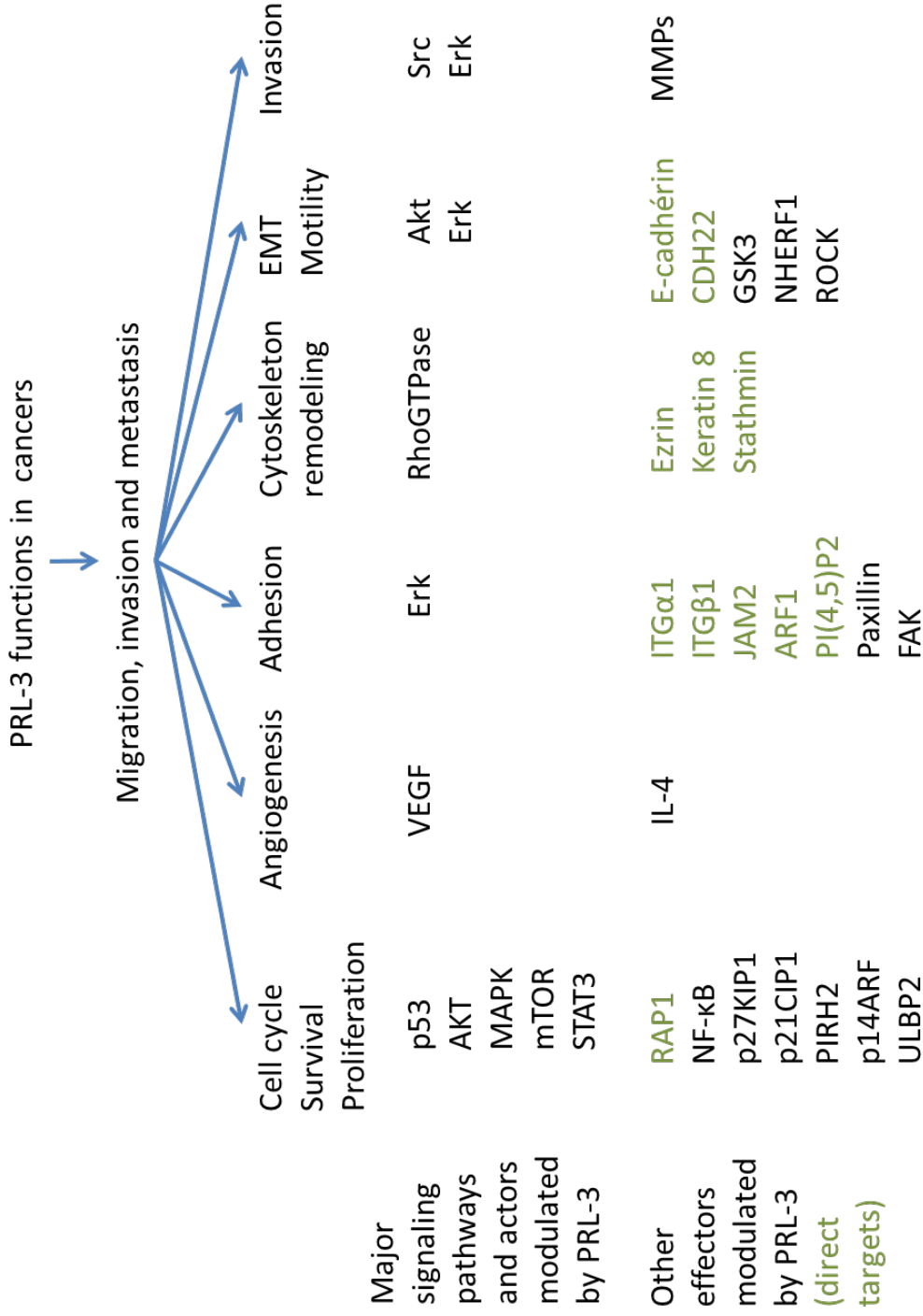
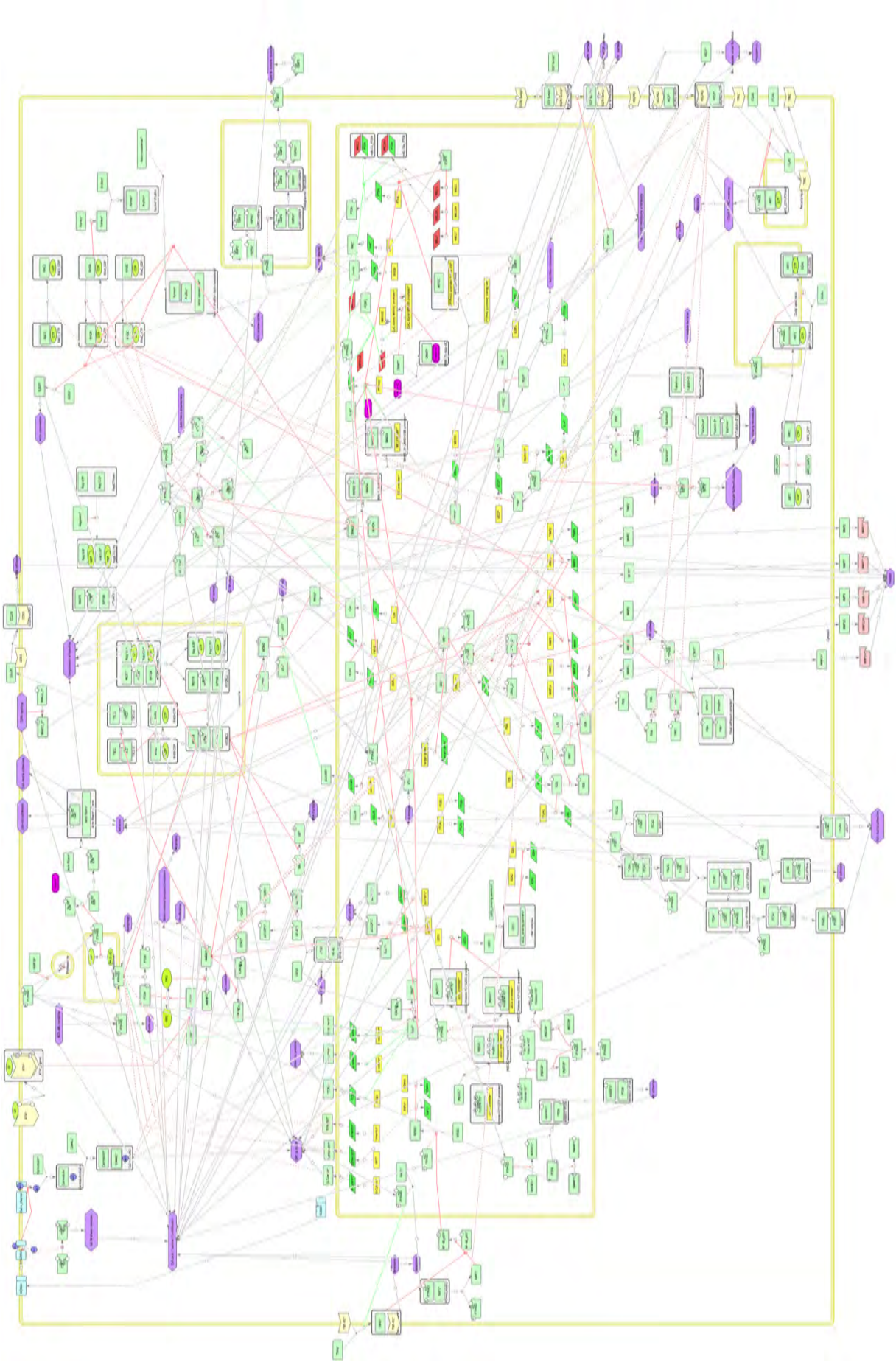


Figure 4. Main players and signalling pathways regulated by PRL-3 in the key step processes of tumorigenesis and metastasis development.



Supplementary Figure 1. Literature based network map of PRL-3 involvement in cancer. The network was manually constructed in CellDesigner. It covers 117 proteins, represents 364 reactions and is based on 63 scientific papers.

Discussion

Un besoin de traitements efficaces contre les métastases hépatiques

Le mélanome uvéal est une tumeur rare mais il s'agit de la tumeur maligne intraoculaire la plus fréquente chez l'adulte. De plus, cette tumeur est très agressive puisque, malgré le traitement efficace de la tumeur primaire, jusqu'à 50% des patients développent des métastases majoritairement hépatiques. Celles-ci sont souvent la cause du décès des patients et le délai de survie moyen après apparition de ces métastases est d'environ six mois. En effet, il n'existe actuellement pas de traitement efficace pour soigner les métastases et ainsi améliorer le taux de survie.

Il a été montré que les tumeurs primaires ont souvent déjà disséminées au moment du diagnostic [119] ce qui pourrait être expliqué par le fait que les altérations chromosomiques du mélanome uvéal apparaissent précocement au cours du développement tumoral dont celles impliquées dans le développement métastatiques, telle que la mutation BAP1 [226]. Cette dissémination précoce expliquerait ainsi pourquoi les traitements plus agressifs contre la tumeur primaire n'augmentent pas le taux de survie. Il y a donc un besoin urgent de développer de nouvelles thérapies soit en permettant de prévenir l'apparition de métastases par thérapies adjuvantes soit en permettant de soigner les métastases hépatiques de façon efficaces.

L'une des raisons qui explique la formation de métastases préférentiellement dans le foie est que le mélanome uvéal dissémine très majoritairement par voie hématogène, les vaisseaux lymphatiques n'étant pas présent dans l'œil [531]. De plus, comme décrit dans le chapitre I, le microenvironnement de l'organe dans lequel se forment les métastases est un facteur essentiel pour permettre la colonisation, la survie et la croissance des cellules tumorales. Or, il a été montré que les cellules de mélanome uvéal surexpriment certains récepteurs tels que IGF1R (Insulin-like Growth Factor 1 Receptor), MET et CXCR4 dont les ligands respectifs (IGF1, HGF (Hepatocyte Growth Factor) et CXCL12) sont fortement exprimés dans le foie ce qui pourrait expliquer que les métastases se forment préférentiellement dans cet organe qui correspondrait à l'environnement le plus favorable pour la colonisation des cellules de mélanome uvéal. Des études ont montré que la surexpression des récepteurs IGF1R et MET corrèle avec le développement des métastases hépatiques [532], [533]. De même, l'inhibition de la fixation du ligand CXCL12 à son récepteur CXCR4 à l'aide d'anticorps anti-CXCL12 ou l'inhibition de l'expression du gène CXCR4 par ARN interférence diminuent la réponse chimiotactique de cellules de mélanome uvéal (OCM-3, OCM-8 et MEL270) à des facteurs solubles sécrétés par des cellules de foie humain. De plus, l'inhibition de l'expression du gène CXCR4 par ARN interférence dans les mêmes cellules de mélanome uvéal diminue la formation de métastases dans le foie chez les souris SCID comparées aux cellules contrôles [534]. Ces arguments sont en faveur de l'hypothèse que l'expression du récepteur CXCR4 semble être importante pour la dissémination préférentielle de ces cellules dans le foie.

En plus de potentiellement favoriser la colonisation dans le foie, la surexpression de ces récepteurs joue un rôle dans le développement tumoral. En effet, il a été montré que l'activation du récepteur IGF1R semble jouer un rôle dans l'adhérence cellule-cellule et dans l'invasion tumorale [535]. Son activation permet l'activation des voies de signalisation MAPK et PI3K [536]. Des études d'inhibition du récepteur IGF1R dans des cellules de mélanome uvéal ont montré une diminution de la prolifération et de la survie de ces cellules [537], [538]. Le récepteur MET joue également un rôle important dans la prolifération, la

survie et la migration cellulaires [539]–[542]. L'activation de Met induit le recrutement de protéines tels que PI3K et Src qui activent à leur tour de nombreuses voies de signalisation [540], [543]. L'activation de MET agit aussi comme un facteur mitogène pour les mélanocytes. Enfin, l'activation de CXCR4 conduit notamment à l'activation PI3K et entraîne la transduction d'une grande variété de signaux intracellulaires de survie, prolifération, migration et adhérence [544]. L'expression de CXCR4 dans les cellules tumorales est un marqueur de mauvais pronostic [545], [546].

Ces récepteurs apparaissent donc comme des cibles thérapeutiques potentielles dans le mélanome uvéal pour prévenir l'apparition de métastases hépatiques. L'effet du Crizotinib, qui inhibe la phosphorylation de Met, est d'ailleurs étudié en essai clinique comme traitement adjuvant. Les résultats obtenus sont plutôt encourageants puisque il a été montré que le Crizotinib réduit de façon significative le développement de métastases dans un modèle murin. Cependant, il n'est pas suffisant pour inhiber la croissance de la tumeur ce qui suggère que d'autres récepteurs de tyrosines kinases, tels que EGFR et IGF1R, sont critiques dans la prolifération cellulaire et la survie des cellules de mélanome uvéal [231], [232]. Les études sur l'inhibition de ces récepteurs doivent donc être poursuivies.

Rôle de PRL-3 et CRMP2 dans le mélanome uvéal

L'absence de traitement efficace contre le mélanome uvéal pousse à mieux comprendre le processus métastatique du mélanome uvéal et à rechercher de nouvelles cibles thérapeutiques. Pour cela, une analyse transcriptomique a été réalisée à l'Institut Curie sur 28 tumeurs primaires issues de patients ayant développé des métastases dans les trois ans suivant l'énucléation (méta1 - classe 2) et sur 29 tumeurs issues de patients n'ayant pas développé de métastases dans le même intervalle de temps (méta0 –classe 1). Sur les 983 gènes identifiés comme différentiellement exprimés entre les deux catégories de tumeurs, le gène PTP4A3/PRL-3 localisé dans la région 8q21 correspondait au gène le plus significativement différentiel exprimé entre ces deux groupes de tumeurs. De plus, sa surexpression est fortement prédictive de la survie des patients [170]. En plus d'être un marqueur de mauvais pronostic, les études réalisées dans le laboratoire ont montrées que PRL-3 avait un rôle dans les processus de migration et d'invasion cellulaire. De nombreuses études ont montré l'implication de PRL-3 dans le développement tumoral et métastatique dans de nombreux cancers. Parmi les cibles déjà identifiées de PRL-3 se trouvent des protéines impliquées dans l'adhérence (intégrine α 1, intégrine β 1, JAM2, ARF1, PI(4,5)P2), des protéines impliquées dans la TEM (CDH22) mais également des protéines impliquées dans le remodelage du cytosquelette (Ezrin, stathmine, kératine 8). L'analyse phosphoprotéomique réalisée au laboratoire a permis d'identifier CRMP2 qui est également une protéine impliquée dans le remodelage du cytosquelette. En effet, comme décrit précédemment, CRMP2 est capable de réguler la dynamique des microtubules et de l'actine dans les neurones pour permettre notamment le guidage axonal et l'élongation des neurites.

Les études menées au cours de ma thèse ont permis de montrer que PRL-3 et CRMP2 interagissent et que CRMP2 est moins phosphorylé sur le T514 après interaction avec la phosphatase. Ces données suggèrent donc que CRMP2 est une cible de PRL-3. Bien que l'étude de la co-localisation subcellulaire, par immunofluorescence (IF), des deux protéines n'ait pas pu être réalisée (les anticorps anti-CRMP2 n'étant pas efficaces en IF) on peut supposer que ces deux protéines peuvent se trouver au niveau des

endosomes. En effet, comme décrit précédemment, PRL-3 est localisé majoritairement à la membrane plasmique et à la surface des endosomes précoces. CRMP2 est une protéine cytosolique qui joue un rôle dans le trafic vésiculaire notamment en servant d'adaptateur entre les moteurs moléculaires dynéine et kinésine et la protéine MICAL-L1 pour permettre le transport des endosomes [547].

L'étude de l'état de phosphorylation de CRMP2 par électrophorèse bidimensionnelle a montré que tandis que CRMP2 est moins phosphorylé sur la T514 dans les cellules exprimant PRL-3, le niveau de phosphorylation de CRMP2 est augmenté sur d'autres acides aminés. Cela pourrait être dû à une activation de la kinase Src induite par PRL-3. En effet, une analyse phosphoprotéomique a montré que l'expression de PRL-3 induisait une augmentation de la phosphorylation des résidus tyrosines due majoritairement à l'activation de Src [548]. Or, CRMP2 possède de nombreux résidus tyrosines phosphorylables (voir **Figure IV.7**). De plus, la surexpression de Src est de mauvais pronostic dans le mélanome uvéal (base de données TCGA). Nos études ont également permis de montrer que l'extinction de CRMP2 dans les cellules exprimant PRL-3 augmente la capacité de migration et d'invasion des cellules de mélanome uvéal et induit un remodelage du cytosquelette d'actine avec une diminution des fibres de stress. Nous avons également observé dans ces mêmes cellules un retard à la repolymérisation des microtubules, après traitement au nocodazole (agent qui induit la dépolymérisation des microtubules), ce qui confirme le rôle de CRMP2 dans le remodelage de cytosquelette mis en évidence dans les neurones. Cependant, de façon intéressante, l'effet de l'extinction de CRMP2, que ce soit sur la migration et l'invasion ou le remodelage du cytosquelette, n'est observé que lorsque PRL-3 est exprimé ce qui signifie que l'expression de la phosphatase est nécessaire pour révéler les effets de la perte de CRMP2. De plus bien que l'état de phosphorylation de CRMP2 soit modifié dans les cellules exprimant PRL-3, l'effet observé sur la migration et l'invasion est renforcé par la perte de CRMP2. Cela pourrait être expliqué par le fait que dans les OCM-1, CRMP2 est beaucoup plus abondant que PRL-3. Ainsi, la déphosphorylation de CRMP2 induite par PRL-3 dans ces cellules n'est peut-être pas suffisante pour en voir les effets. En revanche, dans les tumeurs de mélanome uvéal, il y a un déséquilibre 8p/8q qui favorise le ratio PRL-3/CRMP2. Dans ce cas, la déphosphorylation de CRMP2 par PRL-3 serait plus efficace et donc les effets sur le remodelage du cytosquelette mais également sur la migration et l'invasion seraient visibles. Il a été montré que la migration des lymphocytes T induite par CXCL12 diminue la phosphorylation de CRMP2 sur les résidus T509 et T514, augmente la phosphorylation sur le Y479 et que la phosphorylation sur le Y479 de CRMP2 est importante pour la migration. Ces résultats sont en corrélation avec ce que l'on observe dans les cellules de mélanome uvéal dans lesquelles l'expression de PRL-3 augmente la migration cellulaire et modifie la phosphorylation de CRMP2 en diminuant la phosphorylation sur le T514 et en augmentant la phosphorylation sur d'autres résidus, probablement des tyrosines. Il serait donc intéressant d'investiguer si la phosphorylation des résidus tyrosines de CRMP2 et la déphosphorylation des sites ciblés par GSK-3 β , tels que le T514, sont liées et que ces actions combinées aboutissent à la désactivation de CRMP2 ou bien s'il s'agit de deux mécanismes distincts régulés par des voies qui ne sont liées entre elles.

Les études réalisées sur les propriétés micro-rhéologiques des cellules montrent que l'expression de PRL-3 et/ou la perte de CRMP2 augmentent la rigidité, l'élasticité et la viscosité du cytoplasme, ce qui suggère que la perte de CRMP2 est équivalente à sa déphosphorylation par PRL-3 en ce qui concerne ces

propriétés. Cependant, ces modifications ne sont pas explicatives de la migration et de l'invasion puisque la perte de CRMP2 dans les cellules exprimant le mutant C104S change les propriétés micro-rhéologiques tandis que la migration n'est pas affectée dans ces cellules. Cela suggère donc que l'invasion induite par PRL-3 nécessite d'autres cibles de la phosphatase.

Bien que nos études aient mis en évidence un rôle de CRMP2 dans la migration et l'invasion du mélanome uvéal via un remodelage du cytosquelette, le mécanisme à l'origine de ce remodelage reste encore à élucider. Au cours de ma thèse, j'ai investigué le rôle potentiel de CRMP2 dans l'inhibition de ROCKII. En effet, une étude a montré que la forme longue de CRMP2 (CRMP2-A) déphosphorylée sur les sites de GSK-3 β (T509, T514, S518) inhibe ROCKII et inhibe ainsi la migration et l'invasion dans le carcinome du colon [440]. Dans les cellules de mélanome uvéal il semble que la forme CRMP2-A soit très peu exprimée et fortement minoritaire par rapport à la forme CRMP2-B car en western blot, on visualise une bande située à 64 kDa (CRMP2-B) et quelques fois, si l'on augmente le temps d'exposition de la membrane, une faible bande apparaît à 75 kDa (CRMP2-A). Néanmoins, CRMP2-A est également minoritaire dans les cellules MDA-MB-231 et SW480 dans lesquelles l'étude a été réalisée. Les résultats de ces investigations n'ont cependant pas été concluants étant donné que dans les cellules de mélanome uvéal, l'inhibition de ROCKII, par le Y27632, augmente la capacité de migration ce qui montre que ROCKII est un frein à la migration dans ces cellules contrairement aux cellules de carcinome du colon SW620, dans lesquelles ROCKII favorise la migration cellulaire. En effet, les effets de ROCKII, kinase impliquée dans la stabilisation des filaments d'actine et de leur contractilité, sur la migration varient en fonction du type cellulaire. Souvent associé à une migration accrue en permettant la contraction des filaments par la myosin II, ROCKII peut également être un frein à ce processus car il a été montré que dans certaines cellules, la présence de filaments d'actine correspond à un état stationnaire des cellules qui ne permet pas leur motilité [549]. Il serait néanmoins intéressant de déterminer le ratio de CRMP2-A et CRMP2-B dans les tumeurs de patients pour voir si CRMP2-A est plus abondant dans celles-ci.

Une autre hypothèse pouvant expliquer le rôle de CRMP2 dans la migration et l'invasion du mélanome uvéal, est son rôle dans le trafic vésiculaire via son action sur les moteurs moléculaires dynéine et kinésine. Une étude réalisée dans le laboratoire suggère que PRL-3 agit en amont de la métalloprotéase transmembranaire MMP14 (ou MT1-MMP) à travers une accélération de son trafic vésiculaire et son accumulation à la surface des cellules afin de promouvoir la migration et l'invasivité cellulaires [550]. En effet, il a été montré que MMP14 est enrichie à la surface des cellules de mélanome uvéal surexprimant PRL-3. Cette accumulation est accompagnée d'une augmentation de la sécrétion de MMP2 dans le milieu extracellulaire. De plus, il a été montré que PRL-3 et MMP14 s'associent physiquement et que le trafic vésiculaire de la métalloprotéase est accéléré en présence de PRL-3. Enfin, l'inhibition de l'expression de MMP14 dans les cellules exprimant PTP4A3 diminue leur migration *in vitro* et invasivité *in vivo*. Un autre acteur majeur impliqué dans la tumorigenèse du mélanome uvéal via son rôle dans le trafic vésiculaire est la petite GTPase ARF6 [551]. Une étude a montré que ARF6 régule la sécrétion de MMP14 et promeut ainsi l'invasion dans le cancer du sein [552]. De plus, il a été montré que PRL-3 et ARF6 coimmunoprécipitent dans les cellules Hela [344]. Ainsi, l'hypothèse en cours d'investigation au laboratoire, est que, de même que PRL-3, CRMP2 et ARF6 seraient également impliqués dans le trafic vésiculaire de MMP14 dans le mélanome uvéal (**Figure VI.1**). L'étude de l'accumulation membranaire de

MMP14 a montré que la métalloprotéase est enrichie à la surface des cellules lorsque CRMP2 est éteint suggérant que CRMP2 régule négativement l'accumulation membranaire de MMP14 ce qui est en corrélation avec son effet inhibiteur sur la migration et l'invasion dans le mélanome uvéal.

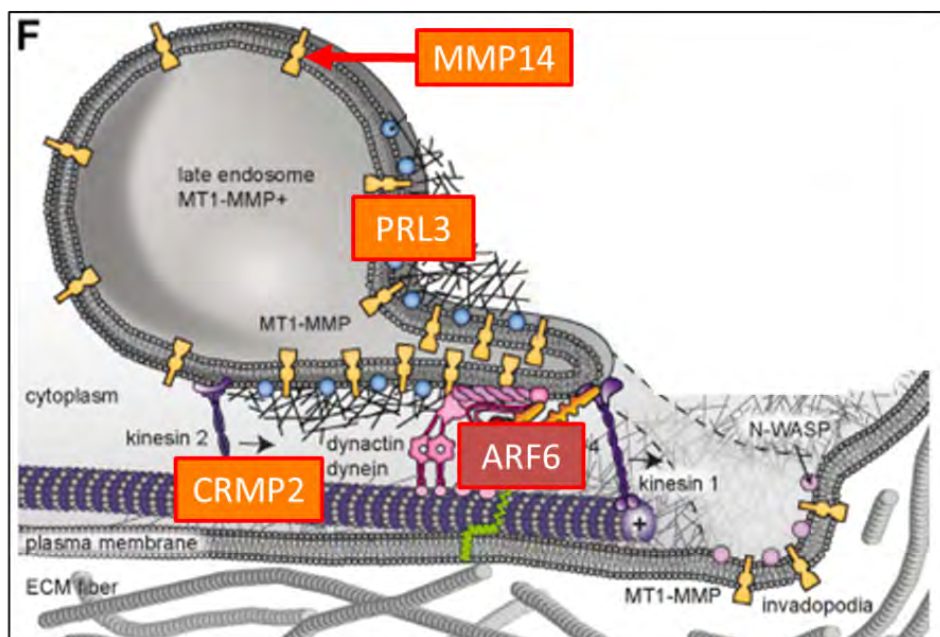


Figure VI.1 : Schéma montrant les acteurs impliqués dans le transport vésiculaire de MMP14.

Le transport des endosomes contenant MMP14 est modulé par différents acteurs dont ARF6 qui régule les moteurs dynéine et kinésine pour délivrer MMP14 à la surface des cellules dans le cancer du sein. Sur ce schéma, PRL-3, localisé à la membrane des endosomes, est également impliqué dans le transport vésiculaire de MMP14 dans le mélanome uvéal. Compte-tenu du rôle de CRMP2 dans le trafic vésiculaire via les moteurs moléculaires, la protéine pourrait également être localisée au niveau de ces endosomes et être impliquée dans le transport de MMP14.

Figure adaptée de (Marchesin et al., 2015).

Il a également été montré que CRMP2 était impliqué dans le processus de réparation de l'ADN induit par le stress de réplication [553]. En effet, un stress réplcatif induit par l'aphidicoline active la kinase ATM et son co-facteur ATMIN impliqués dans la réparation des dommages à l'ADN. L'analyse phosphoprotéomique a montré que ATMIN provoquait la phosphorylation de CRMP2 sur le S522 et que cette phosphorylation est requise pour la survie cellulaire en réponse au stress réplcatif. La perte de CRMP2 ou son absence de phosphorylation sur le S522 induit une instabilité chromosomique. Le rôle de CRMP2 dans l'instabilité génomique du mélanome uvéal a donc été investigué. Pour cela, nous avons regardé la présence de micronoyaux dans les cellules. Les micronoyaux étant soit le témoin d'une instabilité génétique soit de dommages chromosomiques. Les résultats préliminaires montrent que l'expression de PRL-3 augmente le pourcentage de cellules ayant des micronoyaux (Figure VI.2) et l'extinction de CRMP2 dans les cellules exprimant PRL-3 augmente encore ce pourcentage. Là encore, l'effet de l'extinction de CRMP2 est visible uniquement lorsque PRL-3 est exprimé. Ces données sont en corrélation avec la quantification du nombre de foyers γ H2AX qui permet de mettre en évidence les

Discussion

cassures doubles brins de l'ADN. Le nombre de foyers moyen passe de 7,3 dans les GFPshCtrl à 10,3 dans les PRL3shCtrl et augmente à 13,5 dans les PRL3shCRMP2. Il semblerait donc que la perte de CRMP2 de même que sa déphosphorylation par PRL-3 induisent des problèmes de réparation de l'ADN dans les cellules de mélanome uvéal. Il serait intéressant de savoir si la surexpression de PRL-3 observée dans les mélanomes uvéaux de mauvais pronostics est un phénomène précoce du développement tumoral.

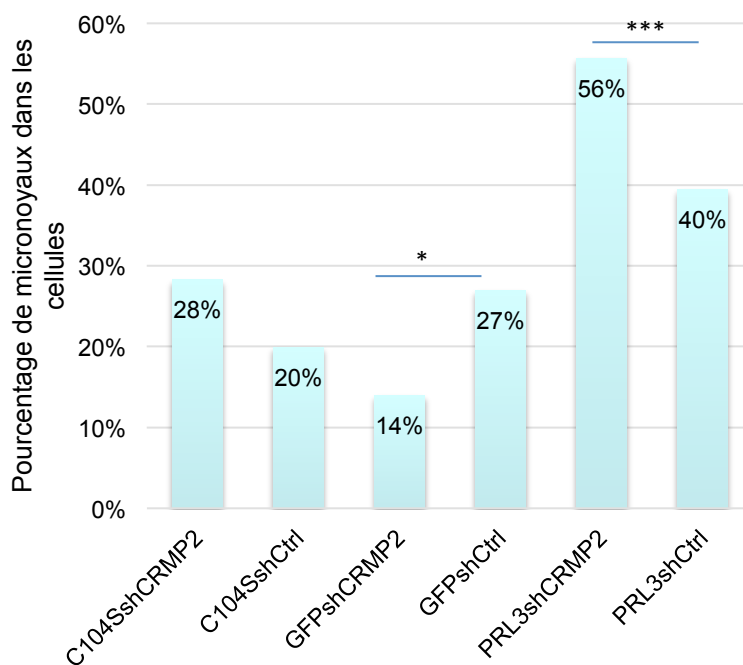
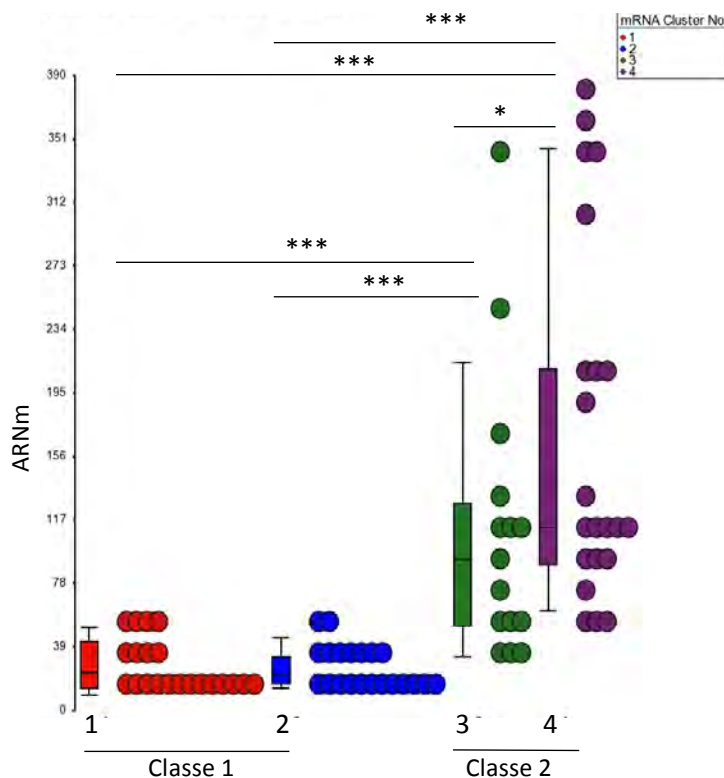


Figure VI.2 : Quantification du pourcentage de micronoyaux dans les OCM-1.

Les noyaux des cellules sont marqués au DAPI.

L'analyse des données de TCGA dans les 4 catégories de tumeurs montre que l'expression de PRL-3 est différentielle entre les sous-groupes 1-2 vs 3-4 mais n'est pas ou peu différentielle entre les sous-groupes 1 vs 2 et 3 vs 4 (Figure VI.3). Ces résultats suggèrent donc que la surexpression de PRL-3 est un événement correspondant aux tumeurs de classe 2 (sous-groupes 3 et 4). Malgré cela, la surexpression de PRL-3 peut tout de même apparaître à un stade précoce du développement tumoral, comme cela a été montré pour BAP1 [226]. Il serait ainsi possible que la déphosphorylation de CRMP2 sur le T522 contribue à la mise en place des anomalies caryotypiques que l'on observe de façon récurrentes dans les tumeurs. Si les mutations perte de fonction de BAP1 (BRCA1 associated protein) que l'on observe précocement dans les tumeurs de mauvais pronostic dégradent encore la qualité de la réparation des lésions de l'ADN, il serait possible que la surexpression de PRL-3 contribue à installer les anomalies secondaires observées au niveau génomique dans ces tumeurs.



sous- groupes	4 vs. 3	4 vs. 2	4 vs. 1	3 vs. 2	3 vs. 1	2 vs. 1
p-value	0.0149527	2.86316e-009	2.89553e-009	0.000543912	0.000548155	0.997937

Figure VI.3 : Expression de PRL-3 dans les tumeurs de mélanome uvéal.

Taux d'expression de l'ARNm de PRL-3 de 80 tumeurs de mélanome uvéal provenant de la base de données TCGA réparties en quatre sous-groupes. Figure réalisée avec l'aide d'Antoine Forget.

En plus d'avoir montré que PRL-3 induit la migration et l'invasion du mélanome uvéal en régulant le remodelage du cytosquelette via CRMP2 et en régulant le trafic vésiculaire de MMP14, une autre étude réalisée au laboratoire a montré que PRL-3 intervient également dans l'adhérence cellulaire. En effet, il a été montré que l'intégrine $\beta 1$ est nécessaire à la migration cellulaire induite par PRL-3. PRL-3 interagit avec l'intégrine $\beta 1$ et FAK et l'expression de PRL-3 diminue la phosphorylation de l'intégrine $\beta 1$ dans la région intracytoplasmique S/T qui est un motif important pour l'adhérence cellulaire. De plus, PRL-3 régule l'assemblage de l'intégrine $\beta 1$ dans les plaques d'adhérences sur collagène I. Enfin, l'ancrage de PRL-3 à la membrane plasmique est nécessaire à son effet pro-migratoire [279].

PRL-3 semble donc avoir des effets multiples pour promouvoir la migration et l'invasion dans les cellules de mélanome uvéal.

PRL-3 comme cible thérapeutique

La réalisation de la carte du réseau d'interactions et des voies de signalisation modulées par PRL-3 dans les cancers et son analyse par le logiciel BiNoM a permis de mettre en évidence l'implication de PRL-3 dans l'ensemble des étapes clés du développement tumoral et métastatique. Cela fait donc de PRL-3 une cible thérapeutique intéressante pour le mélanome uvéal mais également pour tous les autres cancers dans lesquels PRL-3 est impliqué.

De nombreuses molécules ont été identifiées comme pouvant inhiber PRL-3 et certaines sont actuellement en cours d'études. Parmi les inhibiteurs potentiels de PRL-3, la pentamidine, qui est un agent antiparasitaire utilisé dans la prévention et le traitement de la pneumocystose et le traitement des trypanosomiasés et des leishmaniosés viscérales et cutanées, a été montrée comme pouvant inhiber l'activité phosphatase des PRLs [371].

PRL-3 est une protéine qui est surexprimé dans le foie lors de la régénération, d'où son nom « phosphatase of regenerating liver 3 », on peut donc se demander si PRL-3 serait impliqué dans le tropisme hépatique du mélanome uvéal. Cependant, bien que l'immunothérapie ciblant PRL-3 donne des résultats encourageants, il semble peu probable que l'inhibition de la phosphatase seule soit suffisante pour empêcher le développement de métastases par traitement adjuvant ou soigner les métastases. Néanmoins, PRL-3 étant impliquée dans les processus clés tels du développement métastatique, son inhibition en combinaison avec d'autres molécules inhibant d'autres voies permettrait peut-être d'obtenir un traitement efficace. En effet, la transformation cellulaire et le développement métastatique du mélanome uvéal nécessitent une multitude d'étapes (chapitre I) avec une accumulation de nombreuses anomalies dont la somme aboutit à la formation d'une tumeur. De plus, à la vue de l'inefficacité des traitements impliquant le blocage d'une seule protéine ou une seule voie de signalisation, il semble donc que les nouvelles thérapies doivent correspondre à une combinaison de plusieurs molécules ciblant plusieurs voies.

Bibliographie

- [1] D. Stehelin, H. E. Varmus, J. M. Bishop, and P. K. Vogt, "DNA related to the transforming gene(s) of avian sarcoma viruses is present in normal avian DNA," *Nature*, vol. 260, no. 5547, pp. 170–173, 1976.
- [2] C. J. Tabin, S. M. Bradley, C. I. Bargmann, R. A. Weinberg, A. G. Papageorge, E. M. Scolnick, R. Dhar, D. R. Lowy, and E. H. Chang, "Mechanism of activation of a human oncogene," *Nature*, vol. 300, no. 5888, pp. 143–149, 1982.
- [3] L. A. Garraway and E. S. Lander, "Lessons from the cancer genome," *Cell*, vol. 153, no. 1, pp. 17–37, 2013.
- [4] S. Negrini, V. G. Gorgoulis, and T. D. Halazonetis, "Genomic instability — an evolving hallmark of cancer," *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 11, no. 3, pp. 220–228, 2010.
- [5] E. Y. H. P. Lee and W. J. Muller, "Oncogenes and tumor suppressor genes.," *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, vol. 2, no. 10, p. a003236, 2010.
- [6] B. Vogelstein, N. Papadopoulos, V. E. Velculescu, S. Zhou, L. a Diaz, and K. W. Kinzler, "Cancer Genome Landscapes," *Science (80-.)*, vol. 339, no. 6127, pp. 1546–1558, 2013.
- [7] D. Hanahan, R. a Weinberg, and S. Francisco, "The Hallmarks of Cancer Review University of California at San Francisco," vol. 100, pp. 57–70, 2000.
- [8] L. Yang, Y. Pang, and H. L. Moses, "TGF-beta and immune cells: an important regulatory axis in the tumor microenvironment and progression.," *Trends Immunol.*, vol. 31, no. 6, pp. 220–7, 2010.
- [9] M. Vander Heiden, L. Cantley, and C. Thompson, "Understanding the Warburg effect: The metabolic Requirements of cell proliferation," *Science (80-.)*, vol. 324, no. 5930, pp. 1029–1033, 2009.
- [10] R. G. Jones and C. B. Thompson, "Tumor suppressors and cell metabolism: a recipe for cancer growth," *Genes Dev.*, vol. 23, no. 5, pp. 537–548, 2009.
- [11] J. Yang and R. A. Weinberg, "Epithelial-mesenchymal transition: at the crossroads of development and tumor metastasis.," *Dev. Cell*, vol. 14, no. 6, pp. 818–29, 2008.
- [12] C. L. Chaffer and R. A. Weinberg, "A Perspective on Cancer Cell Metastasis," *Science (80-.)*, vol. 331, no. 6024, pp. 1559–1564, 2011.
- [13] D. Hanahan and R. A. Weinberg, "Hallmarks of cancer: The next generation," *Cell*, vol. 144, no. 5, pp. 646–674, 2011.
- [14] A. Méjean and T. Le Bret, "La cascade métastatique : angiogenèse et nouveaux concepts," *Prog. en Urol.*, vol. 18, no. SUPPL. 7, pp. S156–S166, 2008.
- [15] T. Le Bret and A. Méjean, "Physiopathologie de la métastase : du primitif au secondaire," *Prog. en Urol.*, vol. 18, no. SUPPL. 7, pp. S147–S155, 2008.
- [16] P. Polakis, "The many ways of Wnt in cancer," *Curr. Opin. Genet. Dev.*, vol. 17, no. 1, pp. 45–51,

Bibliographie

- 2007.
- [17] T. Reya and H. Clevers, "Wnt signalling in stem cells and cancer," *Nature*, vol. 434, no. 7035, pp. 843–850, 2005.
- [18] G. A. Wildenberg, M. R. Dohn, R. H. Carnahan, M. A. Davis, N. A. Lobdell, J. Settleman, and A. B. Reynolds, "p120-catenin and p190RhoGAP regulate cell-cell adhesion by coordinating antagonism between Rac and Rho.," *Cell*, vol. 127, no. 5, pp. 1027–39, 2006.
- [19] N. K. Noren, C. M. Niessen, B. M. Gumbiner, and K. Burridge, "Cadherin engagement regulates Rho family GTPases.," *J. Biol. Chem.*, vol. 276, no. 36, pp. 33305–8, 2001.
- [20] P. Friedl and K. Wolf, "Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms.," *Nat. Rev. Cancer*, vol. 3, no. 5, pp. 362–74, 2003.
- [21] L. Blanchoin, K. J. Amann, H. N. Higgs, J.-B. Marchand, D. A. Kaiser, and T. D. Pollard, "Direct observation of dendritic actin filament networks nucleated by Arp2/3 complex and WASP/Scar proteins," *Nature*, vol. 404, no. 6781, pp. 1007–1011, 2000.
- [22] R. Rohatgi, L. Ma, H. Miki, M. Lopez, T. Kirchhausen, T. Takenawa, and M. W. Kirschner, "The interaction between N-WASP and the Arp2/3 complex links Cdc42-dependent signals to actin assembly.," *Cell*, vol. 97, no. 2, pp. 221–31, 1999.
- [23] K. Kaibuchi, S. Kuroda, and M. Amano, "Regulation of the Cytoskeleton and Cell Adhesion by the Rho Family GTPases in Mammalian Cells," *Annu. Rev. Biochem.*, vol. 68, no. 1, pp. 459–486, 1999.
- [24] C. D. Nobes and A. Hall, "Rho, rac, and cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia.," *Cell*, vol. 81, no. 1, pp. 53–62, 1995.
- [25] E. Zamir and B. Geiger, "Molecular complexity and dynamics of cell-matrix adhesions.," *J. Cell Sci.*, vol. 114, no. Pt 20, pp. 3583–90, 2001.
- [26] S. Miyamoto, H. Teramoto, O. A. Coso, J. S. Gutkind, P. D. Burbelo, S. K. Akiyama, and K. M. Yamada, "Integrin function: molecular hierarchies of cytoskeletal and signaling molecules.," *J. Cell Biol.*, vol. 131, no. 3, pp. 791–805, 1995.
- [27] M. A. Schwartz and S. J. Shattil, "Signaling networks linking integrins and rho family GTPases.," *Trends Biochem. Sci.*, vol. 25, no. 8, pp. 388–91, 2000.
- [28] D. Ilić, Y. Furuta, S. Kanazawa, N. Takeda, K. Sobue, N. Nakatsuji, S. Nomura, J. Fujimoto, M. Okada, T. Yamamoto, and S. Aizawa, "Reduced cell motility and enhanced focal adhesion contact formation in cells from FAK-deficient mice," *Nature*, vol. 377, no. 6549, pp. 539–544, 1995.
- [29] S. C. Mueller, G. Gherzi, S. K. Akiyama, Q. X. Sang, L. Howard, M. Pineiro-Sanchez, H. Nakahara, Y. Yeh, and W. T. Chen, "A novel protease-docking function of integrin at invadopodia.," *J. Biol. Chem.*, vol. 274, no. 35, pp. 24947–52, 1999.
- [30] P. Friedl and K. Wolf, "Proteolytic and non-proteolytic migration of tumour cells and leucocytes.," *Biochem. Soc. Symp.*, no. 70, pp. 277–85, 2003.
- [31] E. Ohuchi, K. Imai, Y. Fujii, H. Sato, M. Seiki, and Y. Okada, "Membrane type 1 matrix

- metalloproteinase digests interstitial collagens and other extracellular matrix macromolecules.," *J. Biol. Chem.*, vol. 272, no. 4, pp. 2446–51, 1997.
- [32] K. Katoh, Y. Kano, M. Amano, H. Onishi, K. Kaibuchi, and K. Fujiwara, "Rho-kinase--mediated contraction of isolated stress fibers.," *J. Cell Biol.*, vol. 153, no. 3, pp. 569–84, 2001.
- [33] T. Kaneko-Kawano, F. Takasu, H. Naoki, Y. Sakumura, S. Ishii, T. Ueba, A. Eiyama, A. Okada, Y. Kawano, and K. Suzuki, "Dynamic regulation of myosin light chain phosphorylation by Rho-kinase.," *PLoS One*, vol. 7, no. 6, p. e39269, 2012.
- [34] M. A. Wear, D. A. Schafer, and J. A. Cooper, "Actin dynamics: Assembly and disassembly of actin networks," *Curr. Biol.*, vol. 10, no. 24, pp. R891–R895, 2000.
- [35] L. Zeng, X. Si, W.-P. Yu, H. T. Le, K. P. Ng, R. M. H. Teng, K. Ryan, D. Z.-M. Wang, S. Ponniah, and C. J. Pallen, "PTP α regulates integrin-stimulated FAK autophosphorylation and cytoskeletal rearrangement in cell spreading and migration," *J. Cell Biol.*, vol. 160, no. 1, pp. 137–146, 2003.
- [36] D. A. Potter, J. S. Tirnauer, R. Janssen, D. E. Croall, C. N. Hughes, K. A. Fiacco, J. W. Mier, M. Maki, and I. M. Herman, "Calpain regulates actin remodeling during cell spreading.," *J. Cell Biol.*, vol. 141, no. 3, pp. 647–62, 1998.
- [37] M. Pfaff, X. Du, and M. H. Ginsberg, "Calpain cleavage of integrin beta cytoplasmic domains.," *FEBS Lett.*, vol. 460, no. 1, pp. 17–22, 1999.
- [38] M. S. Bretscher, "Getting membrane flow and the cytoskeleton to cooperate in moving cells.," *Cell*, vol. 87, no. 4, pp. 601–6, 1996.
- [39] H. T. ENTERLINE and D. R. COMAN, "The ameboid motility of human and animal neoplastic cells.," *Cancer*, vol. 3, no. 6, pp. 1033–8, 1950.
- [40] J. P. Thiery, "Epithelial–mesenchymal transitions in tumour progression," *Nat. Rev. Cancer*, vol. 2, no. 6, pp. 442–454, 2002.
- [41] L. A. Davidson and R. E. Keller, "Neural tube closure in *Xenopus laevis* involves medial migration, directed protrusive activity, cell intercalation and convergent extension.," *Development*, vol. 126, no. 20, pp. 4547–56, 1999.
- [42] Y. Hegerfeldt, M. Tusch, E.-B. Bröcker, and P. Friedl, "Collective cell movement in primary melanoma explants: plasticity of cell-cell interaction, beta1-integrin function, and migration strategies.," *Cancer Res.*, vol. 62, no. 7, pp. 2125–30, 2002.
- [43] K. Nabeshima, T. Inoue, Y. Shima, H. Kataoka, and M. Kono, "Cohort migration of carcinoma cells: differentiated colorectal carcinoma cells move as coherent cell clusters or sheets.," *Histol. Histopathol.*, vol. 14, no. 4, pp. 1183–97, 1999.
- [44] M. Polette, C. Gilles, S. de Bentzmann, D. Gruenert, J. M. Tournier, and P. Birembaut, "Association of fibroblastoid features with the invasive phenotype in human bronchial cancer cell lines.," *Clin. Exp. Metastasis*, vol. 16, no. 2, pp. 105–12, 1998.
- [45] A. M. Tester, N. Ruangpanit, R. L. Anderson, and E. W. Thompson, "MMP-9 secretion and MMP-2 activation distinguish invasive and metastatic sublines of a mouse mammary carcinoma system showing epithelial-mesenchymal transition traits.," *Clin. Exp. Metastasis*, vol. 18, no. 7, pp. 553–

- 60, 2000.
- [46] E. Putz, K. Witter, S. Offner, P. Stosiek, A. Zippelius, J. Johnson, R. Zahn, G. Riethmüller, and K. Pantel, "Phenotypic characteristics of cell lines derived from disseminated cancer cells in bone marrow of patients with solid epithelial tumors: establishment of working models for human micrometastases.," *Cancer Res.*, vol. 59, no. 1, pp. 241–8, 1999.
- [47] E. Cukierman, R. Pankov, D. R. Stevens, and K. M. Yamada, "Taking Cell-Matrix Adhesions to the Third Dimension," *Science (80-.)*, vol. 294, no. 5547, pp. 1708–1712, 2001.
- [48] I. Rabinovitz and A. M. Mercurio, "The integrin alpha6beta4 functions in carcinoma cell migration on laminin-1 by mediating the formation and stabilization of actin-containing motility structures.," *J. Cell Biol.*, vol. 139, no. 7, pp. 1873–84, 1997.
- [49] C. M. Waterman-Storer, R. A. Worthylake, B. P. Liu, K. Burridge, and E. D. Salmon, "Microtubule growth activates Rac1 to promote lamellipodial protrusion in fibroblasts," *Nat. Cell Biol.*, vol. 1, no. 1, pp. 45–50, 1999.
- [50] S. Etienne-Manneville and A. Hall, "Rho GTPases in cell biology," *Nature*, vol. 420, no. 6916, pp. 629–635, 2002.
- [51] A. Efimov, N. Schiefermeier, I. Grigoriev, R. Ohi, M. C. Brown, C. E. Turner, J. V. Small, and I. Kaverina, "Paxillin-dependent stimulation of microtubule catastrophes at focal adhesion sites.," *J. Cell Sci.*, vol. 121, no. Pt 2, pp. 196–204, 2008.
- [52] X. D. Ren, W. B. Kiosses, and M. A. Schwartz, "Regulation of the small GTP-binding protein Rho by cell adhesion and the cytoskeleton.," *EMBO J.*, vol. 18, no. 3, p. 578, 1999.
- [53] C. M. Waterman-Storer and E. Salmon, "Positive feedback interactions between microtubule and actin dynamics during cell motility.," *Curr. Opin. Cell Biol.*, vol. 11, no. 1, pp. 61–7, 1999.
- [54] S. Etienne-Manneville, "Microtubules in cell migration.," *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, vol. 29, pp. 471–99, 2013.
- [55] O. C. Rodriguez, A. W. Schaefer, C. A. Mandato, P. Forscher, W. M. Bement, and C. M. Waterman-Storer, "Conserved microtubule[ndash]actin interactions in cell movement and morphogenesis," vol. 5, no. 7, pp. 599–609, 2003.
- [56] S. P. H. Chiang, R. M. Cabrera, and J. E. Segall, "Tumor cell intravasation.," *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, vol. 311, no. 1, pp. C1–C14, 2016.
- [57] W. Guo and F. G. Giancotti, "Integrin signalling during tumour progression," *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 5, no. 10, pp. 816–826, 2004.
- [58] B. Strilic and S. Offermanns, "Intravascular Survival and Extravasation of Tumor Cells," *Cancer Cell*, vol. 32, no. 3, pp. 282–293, 2017.
- [59] M. Tichet, V. Prod'Homme, N. Fenouille, D. Ambrosetti, A. Mallavialle, M. Cerezo, M. Ohanna, S. Audebert, S. Rocchi, D. Giaccherio, F. Boukari, M. Allegra, J.-C. Chambard, J.-P. Lacour, J.-F. Michiels, J.-P. Borg, M. Deckert, and S. Tartare-Deckert, "Tumour-derived SPARC drives vascular permeability and extravasation through endothelial VCAM1 signalling to promote metastasis," *Nat. Commun.*, vol. 6, no. 1, p. 6993, 2015.

- [60] B. Strilic, L. Yang, J. Albarrán-Juárez, L. Wachsmuth, K. Han, U. C. Müller, M. Pasparakis, and S. Offermanns, "Tumour-cell-induced endothelial cell necroptosis via death receptor 6 promotes metastasis," *Nature*, vol. 536, no. 7615, pp. 215–218, 2016.
- [61] J. Massagué and A. C. Obenauf, "HHS Public Access," vol. 529, no. 7586, pp. 298–306, 2016.
- [62] M. Labelle, S. Begum, and R. O. Hynes, "Direct Signaling between Platelets and Cancer Cells Induces an Epithelial-Mesenchymal-Like Transition and Promotes Metastasis," *Cancer Cell*, vol. 20, no. 5, pp. 576–590, 2011.
- [63] D. Schumacher, B. Strilic, K. K. Sivaraj, N. Wettschureck, and S. Offermanns, "Platelet-Derived Nucleotides Promote Tumor-Cell Transendothelial Migration and Metastasis via P2Y2 Receptor," *Cancer Cell*, vol. 24, no. 1, pp. 130–137, 2013.
- [64] I. J. Fidler, "The organ microenvironment and cancer metastasis," *Differentiation*, vol. 70, no. 9–10, pp. 498–505, 2002.
- [65] L. Ossowski and J. A. Aguirre-Ghiso, "Dormancy of metastatic melanoma," *Pigment Cell Melanoma Res.*, vol. 23, no. 1, pp. 41–56, 2010.
- [66] A. F. Chambers, A. C. Groom, and I. C. MacDonald, "Metastasis: Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites," *Nat. Rev. Cancer*, vol. 2, no. 8, pp. 563–572, 2002.
- [67] Y. Kang, P. M. Siegel, W. Shu, M. Drobnjak, S. M. Kakonen, C. Cordón-Cardo, T. A. Guise, and J. Massagué, "A multigenic program mediating breast cancer metastasis to bone.," *Cancer Cell*, vol. 3, no. 6, pp. 537–49, 2003.
- [68] A. J. Minn, G. P. Gupta, P. M. Siegel, P. D. Bos, W. Shu, D. D. Giri, A. Viale, A. B. Olshen, W. L. Gerald, and J. Massagué, "Genes that mediate breast cancer metastasis to lung," *Nature*, vol. 436, no. 7050, pp. 518–524, 2005.
- [69] J. P. Sleeman, B. Cady, and K. Pantel, "The connectivity of lymphogenous and hematogenous tumor cell dissemination: biological insights and clinical implications," *Clin. Exp. Metastasis*, vol. 29, no. 7, pp. 737–746, 2012.
- [70] C. Lugassy, B. P. Eyden, L. Christensen, and J. P. Escande, "Angio-tumoral complex in human malignant melanoma characterised by free laminin: ultrastructural and immunohistochemical observations.," *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.*, vol. 29, no. 1, pp. 19–28, 1997.
- [71] C. Lugassy, R. L. Barnhill, and L. Christensen, "Melanoma and extravascular migratory metastasis.," *J. Cutan. Pathol.*, vol. 27, no. 9, p. 481, 2000.
- [72] L. A. Bentolila, R. Prakash, D. Mihic-Probst, M. Wadehra, H. K. Kleinman, T. S. Carmichael, B. Péault, R. L. Barnhill, and C. Lugassy, "Imaging of Angiotropism/Vascular Co-Option in a Murine Model of Brain Melanoma: Implications for Melanoma Progression along Extravascular Pathways," *Nat. Publ. Gr.*, 2016.
- [73] P. C. Stapor, R. S. Sweat, D. C. Dashti, A. M. Betancourt, and W. L. Murfee, "Pericyte dynamics during angiogenesis: new insights from new identities.," *J. Vasc. Res.*, vol. 51, no. 3, pp. 163–74, 2014.
- [74] M. Crisan, S. Yap, L. Casteilla, C.-W. Chen, M. Corselli, T. S. Park, G. Andriolo, B. Sun, B. Zheng, L.

- Zhang, C. Norotte, P.-N. Teng, J. Traas, R. Schugar, B. M. Deasy, S. Badylak, H.-J. Bühring, J.-P. Giacobino, L. Lazzari, J. Huard, and B. Péault, "A Perivascular Origin for Mesenchymal Stem Cells in Multiple Human Organs," *Cell Stem Cell*, vol. 3, no. 3, pp. 301–313, 2008.
- [75] T. Bald, T. Quast, J. Landsberg, M. Rogava, N. Glodde, D. Lopez-Ramos, J. Kohlmeyer, S. Riesenberger, D. van den Boorn-Konijnenberg, C. Hömig-Hölzel, R. Reuten, B. Schadow, H. Weighardt, D. Wenzel, I. Helfrich, D. Schadendorf, W. Bloch, M. E. Bianchi, C. Lugassy, R. L. Barnhill, M. Koch, B. K. Fleischmann, I. Förster, W. Kastenmüller, W. Kolanus, M. Hölzel, E. Gaffal, and T. Tüting, "Ultraviolet-radiation-induced inflammation promotes angiotropism and metastasis in melanoma," *Nature*, vol. 507, no. 7490, pp. 109–113, 2014.
- [76] R. K. Singh, M. Gutman, R. Reich, and M. Bar-Eli, "Ultraviolet B irradiation promotes tumorigenic and metastatic properties in primary cutaneous melanoma via induction of interleukin 8.," *Cancer Res.*, vol. 55, no. 16, pp. 3669–74, 1995.
- [77] C. Gebhardt, M. Averbeck, A. Viertel, F. Kauer, A. Saalbach, U. Anderegg, and J. C. Simon, "Ultraviolet-B irradiation enhances melanoma cell motility via induction of autocrine interleukin 8 secretion," *Exp. Dermatol.*, vol. 16, no. 8, pp. 636–643, 2007.
- [78] C. Lugassy, S. Zadran, L. A. Bentolila, M. Wadehra, R. Prakash, S. T. Carmichael, H. K. Kleinman, B. Péault, L. Larue, and R. L. Barnhill, "Angiotropism, pericytic mimicry and extravascular migratory metastasis in melanoma: an alternative to intravascular cancer dissemination.," *Cancer Microenviron.*, vol. 7, no. 3, pp. 139–52, 2014.
- [79] Q. Schwarz, C. H. Maden, J. M. Vieira, and C. Ruhrberg, "Neuropilin 1 signaling guides neural crest cells to coordinate pathway choice with cell specification," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 106, no. 15, pp. 6164–6169, 2009.
- [80] C. M. Bailey, J. A. Morrison, and P. M. Kulesa, "Melanoma revives an embryonic migration program to promote plasticity and invasion," *Pigment Cell Melanoma Res.*, vol. 25, no. 5, pp. 573–583, 2012.
- [81] R. Perris and D. Perissinotto, "Role of the extracellular matrix during neural crest cell migration.," *Mech. Dev.*, vol. 95, no. 1–2, pp. 3–21, 2000.
- [82] S. Paget, "THE DISTRIBUTION OF SECONDARY GROWTHS IN CANCER OF THE BREAST.," *Lancet*, vol. 133, no. 3421, pp. 571–573, 1889.
- [83] R. L. Barnhill and C. Lugassy, "Angiotropic malignant melanoma and extravascular migratory metastasis: description of 36 cases with emphasis on a new mechanism of tumour spread," *Pathology*, vol. 36, no. 5, pp. 485–490, 2004.
- [84] C. Lugassy, B. Péault, M. Wadehra, H. K. Kleinman, and R. L. Barnhill, "Could pericytic mimicry represent another type of melanoma cell plasticity with embryonic properties?," *Pigment Cell Melanoma Res.*, vol. 26, no. 5, pp. 746–754, 2013.
- [85] A. Farin, S. O. Suzuki, M. Weiker, J. E. Goldman, J. N. Bruce, and P. Canoll, "Transplanted glioma cells migrate and proliferate on host brain vasculature: A dynamic analysis," *Glia*, vol. 53, no. 8, pp. 799–808, 2006.
- [86] P. Wesseling, D. J. Ruiter, and P. C. Burger, "Angiogenesis in brain tumors; pathobiological and

- clinical aspects.," *J. Neurooncol.*, vol. 32, no. 3, pp. 253–65, 1997.
- [87] C. Lugassy, R. I. Haroun, H. Brem, B. M. Tyler, R. V Jones, P. M. Fernandez, S. R. Patierno, H. K. Kleinman, and R. L. Barnhill, "Pericytic-like angiotropism of glioma and melanoma cells.," *Am. J. Dermatopathol.*, vol. 24, no. 6, pp. 473–8, 2002.
- [88] M. J. Levy, F. C. Gleeson, and L. Zhang, "Endoscopic Ultrasound Fine-Needle Aspiration Detection of Extravascular Migratory Metastasis From a Remotely Located Pancreatic Cancer," *Clin. Gastroenterol. Hepatol.*, vol. 7, no. 2, pp. 246–248, 2009.
- [89] C. Liebig, G. Ayala, J. A. Wilks, D. H. Berger, and D. Albo, "Perineural invasion in cancer," *Cancer*, vol. 115, no. 15, pp. 3379–3391, 2009.
- [90] C. Lugassy, S. E. Vernon, J. W. Warner, C. Q. Le, M. Manyak, S. R. Patierno, and R. L. Barnhill, "Angiotropism of human prostate cancer cells: implications for extravascular migratory metastasis," *BJU Int.*, vol. 95, no. 7, pp. 1099–1103, 2005.
- [91] J. M. Dyke, M. L. Crook, M. Platten, and C. J. R. Stewart, "Extravascular migratory metastasis in gynaecological carcinosarcoma," *Histopathology*, vol. 65, no. 3, pp. 363–370, 2014.
- [92] M. Mravic, G. Asatrian, C. Soo, C. Lugassy, R. L. Barnhill, S. M. Dry, B. Peault, and A. W. James, "From pericytes to perivascular tumours: correlation between pathology, stem cell biology, and tissue engineering," *Int. Orthop.*, vol. 38, no. 9, pp. 1819–1824, 2014.
- [93] G. Fornabaio, R. L. Barnhill, C. Lugassy, L. A. Bentolila, N. Cassoux, S. Roman-Roman, S. Alsafadi, and F. Del Bene, "Angiotropism and extravascular migratory metastasis in cutaneous and uveal melanoma progression in a zebrafish model," *Sci. Rep.*, vol. 8, no. 1, p. 10448, 2018.
- [94] N. M. Le Douarin, E. Dupin, A. Baroffio, and C. Dulac, "New Insights into the Development of Neural Crest Derivatives," *Int. Rev. Cytol.*, vol. 138, pp. 269–314, 1992.
- [95] L. S. Gammill and M. Bronner-Fraser, "Neural crest specification: migrating into genomics," *Nat. Rev. Neurosci.*, vol. 4, no. 10, pp. 795–805, 2003.
- [96] S. P. Delaney, L. M. Julian, and W. L. Stanford, "The neural crest lineage as a driver of disease heterogeneity in Tuberous Sclerosis Complex and Lymphangiomyomatosis," *Front. Cell Dev. Biol.*, vol. 2, p. 69, 2014.
- [97] A. Locascio and M. A. Nieto, "Cell movements during vertebrate development: integrated tissue behaviour versus individual cell migration.," *Curr. Opin. Genet. Dev.*, vol. 11, no. 4, pp. 464–9, 2001.
- [98] D. Meulemans and M. Bronner-Fraser, "Gene-Regulatory Interactions in Neural Crest Evolution and Development," *Dev. Cell*, vol. 7, no. 3, pp. 291–299, 2004.
- [99] R. E. Boissy and T. J. Hornyak, "Extracutaneous Melanocytes," in *The Pigmentary System*, Oxford, UK: Blackwell Publishing Ltd, pp. 91–107, 2006.
- [100] T. Herrling, K. Jung, and J. Fuchs, "The role of melanin as protector against free radicals in skin and its role as free radical indicator in hair," *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.*, vol. 69, no. 5, pp. 1429–1435, 2008.

Bibliographie

- [101] Y. Yamaguchi and V. J. Hearing, "Melanocytes and Their Diseases," *Cold Spring Harb. Perspect. Med.*, vol. 4, no. 5, pp. a017046–a017046, 2014.
- [102] P. J. WAARDENBURG, "A new syndrome combining developmental anomalies of the eyelids, eyebrows and nose root with pigmentary defects of the iris and head hair and with congenital deafness.," *Am. J. Hum. Genet.*, vol. 3, no. 3, pp. 195–253, 1951.
- [103] F. Mouriaux, M. Hamedani, T. Hurbli, Y. Uteza, A. Oubaaz, and S. Morax, "[Waardenburg's syndrome].," *J. Fr. Ophthalmol.*, vol. 22, no. 7, pp. 799–809, 1999.
- [104] M. Tassabehji, V. E. Newton, X. Z. Liu, A. Brady, D. Donnai, M. Krajewska-Walasek, V. Murday, A. Norman, E. Obersztyn, and W. Reardon, "The mutational spectrum in Waardenburg syndrome.," *Hum. Mol. Genet.*, vol. 4, no. 11, pp. 2131–7, 1995.
- [105] V. Pingault, N. Bondurand, K. Kuhlbrodt, D. E. Goerich, M.-O. Préhu, A. Puliti, B. Herbarth, I. Hermans-Borgmeyer, E. Legius, G. Matthijs, J. Amiel, S. Lyonnet, I. Ceccherini, G. Romeo, J. C. Smith, A. P. Read, M. Wegner, and M. Goossens, "SOX10 mutations in patients with Waardenburg-Hirschsprung disease," *Nat. Genet.*, vol. 18, no. 2, pp. 171–173, 1998.
- [106] E. G. Puffenberger, K. Hosoda, S. S. Washington, K. Nakao, D. deWit, M. Yanagisawa, and A. Chakravart, "A missense mutation of the endothelin-B receptor gene in multigenic Hirschsprung's disease.," *Cell*, vol. 79, no. 7, pp. 1257–66, 1994.
- [107] M. L. McHam and A. Fulton, "Albinism.," *Int. Ophthalmol. Clin.*, vol. 32, no. 1, pp. 185–200, 1992.
- [108] S. Park, D. M. Albert, and J. L. Bolognia, "Ocular manifestations of pigmentary disorders.," *Dermatol. Clin.*, vol. 10, no. 3, pp. 609–22, 1992.
- [109] F. Mouriaux, S. Saule, L. Desjardins, and F. Mascarelli, "Les mélanocytes choréïdiens normaux et malins : de la cellule à la clinique," *J. Fr. Ophthalmol.*, pp. 781–793, 2005.
- [110] J. R. Gonder, J. A. Shields, D. M. Albert, J. J. Augsburger, and P. T. Lavin, "Uveal malignant melanoma associated with ocular and oculodermal melanocytosis.," *Ophthalmology*, vol. 89, no. 8, pp. 953–60, 1982.
- [111] C. L. Shields, J. G. Kels, and J. A. Shields, "Melanoma of the eye: revealing hidden secrets, one at a time.," *Clin. Dermatol.*, vol. 33, no. 2, pp. 183–96, 2015.
- [112] A. D. Singh, P. Kalyani, and A. Topham, "Estimating the risk of malignant transformation of a choroidal nevus," *Ophthalmology*, vol. 112, no. 10, pp. 1784–1789, 2005.
- [113] L. E. Zimmerman and I. A. N. W. Mclean, "(Washington, D.C., USA)," pp. 75–82, 1891.
- [114] R. Murali, T. Wiesner, M. K. Rosenblum, and B. C. Bastian, "GNAQ and GNA11 mutations in melanocytomas of the central nervous system.," *Acta Neuropathol.*, vol. 123, no. 3, pp. 457–9, 2012.
- [115] T. Van Den Bosch, *Genetic Prognostic Factors and Follow-up in Uveal Melanoma*. 2012.
- [116] C. C. McLaughlin, X.-C. Wu, A. Jemal, H. J. Martin, L. M. Roche, and V. W. Chen, "Incidence of noncutaneous melanomas in the U.S.," *Cancer*, vol. 103, no. 5, pp. 1000–1007, 2005.

- [117] P. Isager, A. Østerlind, G. Engholm, S. Heegaard, J. Lindegaard, J. Overgaard, and H. H. Storm, "Uveal and Conjunctival Malignant Melanoma in Denmark, 1943–97: Incidence and Validation Study," *Ophthalmic Epidemiol.*, vol. 12, no. 4, pp. 223–232, 2005.
- [118] B. A. Krantz, N. Dave, K. M. Komatsubara, B. P. Marr, and R. D. Carvajal, "Uveal melanoma: epidemiology, etiology, and treatment of primary disease.," *Clin. Ophthalmol.*, vol. 11, pp. 279–289, 2017.
- [119] S. Eskelin, S. Pyrhönen, P. Summanen, M. Hahka-Kemppinen, and T. Kivelä, "Tumor doubling times in metastatic malignant melanoma of the uvea: tumor progression before and after treatment.," *Ophthalmology*, vol. 107, no. 8, pp. 1443–9, 2000.
- [120] S. Kaliki, C. L. Shields, and J. A. Shields, "Uveal melanoma: estimating prognosis.," *Indian J. Ophthalmol.*, vol. 63, no. 2, pp. 93–102, 2015.
- [121] "OMF - disease." [Online]. Available: <http://www.ocularmelanoma.org/disease.htm>. [Accessed: 04-Aug-2018].
- [122] R. P. Gallagher, J. M. Elwood, J. Rootman, J. J. Spinelli, G. B. Hill, W. J. Threlfall, and J. M. Birdsell, "Risk factors for ocular melanoma: Western Canada Melanoma Study," *J Natl Cancer Inst*, vol. 74, no. 4, pp. 775–778, 1985.
- [123] A. Schmidt-Pokrzywniak, K.-H. Jöckel, N. Bornfeld, W. Sauerwein, and A. Stang, "Positive Interaction Between Light Iris Color and Ultraviolet Radiation in Relation to the Risk of Uveal Melanoma," *Ophthalmology*, vol. 116, no. 2, pp. 340–348, 2009.
- [124] M. A. Tucker, J. A. Shields, P. Hartge, J. Augsburger, R. N. Hoover, and J. F. Fraumeni, "Sunlight Exposure as Risk Factor for Intraocular Malignant Melanoma," *N. Engl. J. Med.*, vol. 313, no. 13, pp. 789–792, 1985.
- [125] W. Li, H. Judge, E. S. Gragoudas, J. M. Seddon, and K. M. Egan, "Patterns of tumor initiation in choroidal melanoma.," *Cancer Res.*, vol. 60, no. 14, pp. 3757–60, 2000.
- [126] W. S. Manning, P. G. Greenlee, and J. N. Norton, "Ocular melanoma in a Long Evans rat.," *Contemp. Top. Lab. Anim. Sci.*, vol. 43, no. 1, pp. 44–6, 2004.
- [127] J.-C. A. Marshall, K. D. Gordon, C. S. McCauley, J. P. de Souza Filho, and M. N. Burnier, "The effect of blue light exposure and use of intraocular lenses on human uveal melanoma cell lines," *Melanoma Res.*, vol. 16, no. 6, pp. 537–541, 2006.
- [128] C. M. Vajdic, A. Kricke, M. Giblin, J. McKenzie, J. Aitken, G. G. Giles, and B. K. Armstrong, "Sun exposure predicts risk of ocular melanoma in Australia," *Int. J. Cancer*, vol. 101, no. 2, pp. 175–182, 2002.
- [129] R. A. Wiznia, J. K. Freedman, A. D. Mancini, and J. A. Shields, "Malignant melanoma of the choroid in neurofibromatosis.," *Am. J. Ophthalmol.*, vol. 86, no. 5, pp. 684–7, 1978.
- [130] A. D. Singh, M. X. Wang, L. A. Donoso, C. L. Shields, P. De Potter, J. A. Shields, R. C. Elston, and B. Fijal, "Familial Uveal Melanoma, III," *Arch. Ophthalmol.*, vol. 114, no. 9, p. 1101, 1996.
- [131] P. L. Triozzi, C. Eng, and A. D. Singh, "Targeted therapy for uveal melanoma," *Cancer Treat. Rev.*, vol. 34, no. 3, pp. 247–258, 2008.

Bibliographie

- [132] B. Damato, "Does ocular treatment of uveal melanoma influence survival," *Br. J. Cancer*, vol. 103, no. 3, pp. 285–290, 2010.
- [133] S. J.A. and S. C.L., "Current management of posterior uveal melanoma," *Mayo Clin. Proc.*, vol. 68, no. 12, pp. 1196–1200, 1993.
- [134] J. W. Gamel, I. W. McLean, and J. B. McCurdy, "Biologic distinctions between cure and time to death in 2892 patients with intraocular melanoma.," *Cancer*, vol. 71, no. 7, pp. 2299–305, 1993.
- [135] A. Schmittl, N. E. Bechrakis, P. Martus, D. Mutlu, C. Scheibenbogen, N. Bornfeld, M. H. Foerster, E. Thiel, and U. Keilholz, "Independent prognostic factors for distant metastases and survival in patients with primary uveal melanoma," *Eur. J. Cancer*, vol. 40, no. 16, pp. 2389–2395, 2004.
- [136] B. Damato, C. Duke, S. E. Coupland, P. Hiscott, P. A. Smith, I. Campbell, A. Douglas, and P. Howard, "Cytogenetics of Uveal Melanoma. A 7-Year Clinical Experience," *Ophthalmology*, vol. 114, no. 10, pp. 1925–1932, 2007.
- [137] B. Damato, "Does ocular treatment of uveal melanoma influence survival?," *Br. J. Cancer*, vol. 103, no. 3, pp. 285–290, 2010.
- [138] I. W. McLean, V. S. Saraiva, and M. N. Burnier, "Pathological and prognostic features of uveal melanomas.," *Can. J. Ophthalmol.*, vol. 39, no. 4, pp. 343–50, 2004.
- [139] L. Tarmann, W. Wackernagel, A. Avian, C. Mayer, M. Schneider, P. Winkler, and G. Langmann, "Ruthenium-106 plaque brachytherapy for uveal melanoma," *Br. J. Ophthalmol.*, vol. 99, no. 12, pp. 1644–1649, 2015.
- [140] M. Marinkovic, N. Horeweg, M. Fiocco, F. P. Peters, L. W. Sommers, M. S. Laman, J. C. Bleeker, M. Ketelaars, G. P. M. Luyten, and C. L. Creutzberg, "Ruthenium-106 brachytherapy for choroidal melanoma without transpupillary thermotherapy: Similar efficacy with improved visual outcome," *Eur. J. Cancer*, vol. 68, pp. 106–113, 2016.
- [141] A. Mashayekhi, C. L. Shields, P. Rishi, H. T. Atalay, M. Pellegrini, J. P. McLaughlin, K. A. Patrick, S. J. Morton, M. H. Remmer, A. Parendo, M. A. Schlitt, and J. A. Shields, "Primary Transpupillary Thermotherapy for Choroidal Melanoma in 391 Cases," *Ophthalmology*, vol. 122, no. 3, pp. 600–609, 2015.
- [142] S. Turcotte, D. Bergeron, A. P. Rousseau, and F. Mouriaux, "Primary transpupillary thermotherapy for choroidal indeterminate melanocytic lesions," *Can. J. Ophthalmol. / J. Can. d'Ophthalmologie*, vol. 49, no. 5, pp. 464–467, 2014.
- [143] Collaborative Ocular Melanoma Study Group, "The COMS Randomized Trial of Iodine 125 Brachytherapy for Choroidal Melanoma," *Arch. Ophthalmol.*, vol. 124, no. 12, p. 1684, 2006.
- [144] J. Yang, D. K. Manson, B. P. Marr, and R. D. Carvajal, "Treatment of uveal melanoma: where are we now?," *Ther. Adv. Med. Oncol.*, vol. 10, p. 1758834018757175, 2018.
- [145] "Assessment of Metastatic Disease Status at Death in 435 Patients With Large Choroidal Melanoma in the Collaborative Ocular Melanoma Study (COMS)," *Arch. Ophthalmol.*, vol. 119, no. 5, p. 670, 2001.
- [146] M. Diener-West, S. M. Reynolds, D. J. Agugliaro, R. Caldwell, K. Cumming, J. D. Earle, D. L. Green,

- B. S. Hawkins, J. Hayman, I. Jaiyesimi, J. M. Kirkwood, W.-J. Koh, D. M. Robertson, J. M. Shaw, J. Thoma, and Collaborative Ocular Melanoma Study Group Report 23, "Screening for Metastasis From Choroidal Melanoma: The Collaborative Ocular Melanoma Study Group Report 23," *J. Clin. Oncol.*, vol. 22, no. 12, pp. 2438–2444, 2004.
- [147] E. S. Gragoudas, "Proton Beam Irradiation of Uveal Melanomas: The First 30 Years The Weisenfeld Lecture," *Investig. Ophthalmology Vis. Sci.*, vol. 47, no. 11, p. 4666, 2006.
- [148] S. Landreville, O. A. Agapova, and J. W. Harbour, "Emerging insights into the molecular pathogenesis of uveal melanoma," *Futur. Oncol.*, vol. 4, no. 5, pp. 629–636, 2008.
- [149] C. L. Shields, A. Ganguly, C. G. Bianciotto, K. Turaka, A. Tavallali, and J. A. Shields, "Prognosis of Uveal Melanoma in 500 Cases Using Genetic Testing of Fine-Needle Aspiration Biopsy Specimens," *Ophthalmology*, vol. 118, no. 2, pp. 396–401, 2011.
- [150] C. A. Klein, "Framework models of tumor dormancy from patient-derived observations," *Curr. Opin. Genet. Dev.*, vol. 21, no. 1, pp. 42–49, 2011.
- [151] M. Diener-West, S. M. Reynolds, D. J. Agugliaro, R. Caldwell, K. Cumming, J. D. Earle, B. S. Hawkins, J. A. Hayman, I. Jaiyesimi, L. M. Jampol, J. M. Kirkwood, W.-J. Koh, D. M. Robertson, J. M. Shaw, B. R. Straatsma, J. Thoma, and Collaborative Ocular Melanoma Study Group, "Development of Metastatic Disease After Enrollment in the COMS Trials for Treatment of Choroidal Melanoma," *Arch. Ophthalmol.*, vol. 123, no. 12, p. 1639, 2005.
- [152] S. Eskelin, S. Pyrhönen, M. Hahka-Kemppinen, S. Tuomaala, and T. Kivelä, "A prognostic model and staging for metastatic uveal melanoma," *Cancer*, vol. 97, no. 2, pp. 465–475, 2003.
- [153] J. Couturier and S. Saule, "Genetic determinants of uveal melanoma," *Curr. Concepts Uveal Melanoma*, vol. 49, pp. 150–165, 2011.
- [154] E. Kilic, W. van Gils, E. Lodder, H. B. Beverloo, M. E. van Til, C. M. Mooy, D. Paridaens, A. de Klein, and G. P. M. Luyten, "Clinical and Cytogenetic Analyses in Uveal Melanoma," *Investig. Ophthalmology Vis. Sci.*, vol. 47, no. 9, p. 3703, 2006.
- [155] J. W. Harbour, "Molecular Prognostic Testing and Individualized Patient Care in Uveal Melanoma," *American journal of ophthalmology*, vol. 148, no. 6, p. 823-9, 2009.
- [156] T. Häusler, A. Stang, G. Anastassiou, K.-H. Jöckel, S. Mrzyk, B. Horsthemke, D. R. Lohmann, and M. Zeschnigk, "Loss of heterozygosity of 1p in uveal melanomas with monosomy 3," *Int. J. Cancer*, vol. 116, no. 6, pp. 909–913, 2005.
- [157] E. Kilic, N. C. Naus, W. van Gils, C. C. Klaver, M. E. van Til, M. M. Verbiest, T. Stijnen, C. M. Mooy, D. Paridaens, H. B. Beverloo, G. P. Luyten, and A. de Klein, "Concurrent Loss of Chromosome Arm 1p and Chromosome 3 Predicts a Decreased Disease-Free Survival in Uveal Melanoma Patients," *Investig. Ophthalmology Vis. Sci.*, vol. 46, no. 7, p. 2253, 2005.
- [158] E. Kilic, H. T. Brüggenwirth, M. Meier, N. C. Naus, H. B. Beverloo, J. P. Meijerink, G. P. Luyten, and A. de Klein, "Increased expression of p73 Δ ex2 transcript in uveal melanoma with loss of chromosome 1p," *Melanoma Res.*, vol. 18, no. 3, pp. 208–213, 2008.
- [159] N. Cassoux, M. J. Rodrigues, C. Plancher, B. Asselain, C. Levy-Gabriel, L. Lumbroso-Le Rouic, S.

Bibliographie

- Piperno-Neumann, R. Dendale, X. Sastre, L. Desjardins, and J. Couturier, "Genome-wide profiling is a clinically relevant and affordable prognostic test in posterior uveal melanoma," *Br. J. Ophthalmol.*, vol. 98, no. 6, pp. 769–774, 2014.
- [160] T. van den Bosch, E. Kilic, D. Paridaens, and A. de Klein, "Genetics of Uveal Melanoma and Cutaneous Melanoma: Two of a Kind?," *Dermatol. Res. Pract.*, vol. 2010, pp. 1–13, 2010.
- [161] Y. Aalto, L. Eriksson, S. Seregard, O. Larsson, and S. Knuutila, "Concomitant loss of chromosome 3 and whole arm losses and gains of chromosome 1, 6, or 8 in metastasizing primary uveal melanoma.," *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, vol. 42, no. 2, pp. 313–7, 2001.
- [162] B. Damato, J. Dopierala, A. Klaasen, M. van Dijk, J. Sibbring, and S. E. Coupland, "Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification of Uveal Melanoma: Correlation with Metastatic Death," *Investig. Ophthalmology Vis. Sci.*, vol. 50, no. 7, p. 3048, 2009.
- [163] V. A. White, J. D. Chambers, P. D. Courtright, W. Y. Chang, and D. E. Horsman, "Correlation of cytogenetic abnormalities with the outcome of patients with uveal melanoma.," *Cancer*, vol. 83, no. 2, pp. 354–9, 1998.
- [164] J. P. Ehlers, L. Worley, M. D. Onken, and J. W. Harbour, "Integrative genomic analysis of aneuploidy in uveal melanoma," *Clin. Cancer Res.*, vol. 14, no. 1, pp. 115–122, 2008.
- [165] P. Parrella, D. Sidransky, and S. L. Merbs, "Allelotype of posterior uveal melanoma: implications for a bifurcated tumor progression pathway.," *Cancer Res.*, vol. 59, no. 13, pp. 3032–7, 1999.
- [166] G. Prescher, N. Bornfeld, W. Friedrichs, S. Seeber, and R. Becher, "Cytogenetics of twelve cases of uveal melanoma and patterns of nonrandom anomalies and isochromosome formation.," *Cancer Genet. Cytogenet.*, vol. 80, no. 1, pp. 40–6, 1995.
- [167] M. D. Onken, L. a Worley, J. P. Ehlers, and J. W. Harbour, "Gene Expression Profiling in Uveal Melanoma Reveals Two Molecular Classes and Predicts Metastatic Death Advances in Brief Gene Expression Profiling in Uveal Melanoma Reveals Two Molecular Classes and Predicts Metastatic Death," *Cancer Res*, pp. 7205–7209, 2004.
- [168] J. P. Ehlers and J. W. Harbour, "NBS1 Expression as a Prognostic Marker in Uveal Melanoma," *Clin. Cancer Res.*, vol. 11, no. 5, pp. 1849–1853, 2005.
- [169] J. P. Ehlers, L. Worley, M. D. Onken, and J. W. Harbour, "DDEF1 Is Located in an Amplified Region of Chromosome 8q and Is Overexpressed in Uveal Melanoma," *Clin. Cancer Res.*, vol. 11, no. 10, pp. 3609–3613, 2005.
- [170] C. Laurent, F. Valet, N. Planque, L. Silveri, S. Maacha, O. Anezo, P. Hupe, C. Plancher, C. Reyes, B. Albad, A. Rapinat, D. Gentien, J. Couturier, X. Sastre-Garau, L. Desjardins, J.-P. Thiery, S. Roman-Roman, B. Asselain, E. Barillot, S. Piperno-Neumann, and S. Saule, "High PTP4A3 phosphatase expression correlates with metastatic risk in uveal melanoma patients.," *Cancer Res.*, vol. 71, no. 3, pp. 666–74, 2011.
- [171] S. Hughes, B. E. Damato, I. Giddings, P. S. Hiscott, J. Humphreys, and R. S. Houlston, "Microarray comparative genomic hybridisation analysis of intraocular uveal melanomas identifies distinctive imbalances associated with loss of chromosome 3.," *Br. J. Cancer*, vol. 93, no. 10, pp. 1191–6, 2005.

- [172] J. Trolet, P. Hupé, I. Huon, I. Lebigot, C. Decraene, O. Delattre, X. Sastre-Garau, S. Saule, J. P. Thiéry, C. Plancher, B. Asselain, L. Desjardins, P. Mariani, S. Piperno-Neumann, E. Barillot, and J. Couturier, "Genomic profiling and identification of high-risk uveal melanoma by array CGH analysis of primary tumors and liver metastases," *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.*, vol. 50, no. 6, pp. 2572–2580, 2009.
- [173] M. D. Onken, L. A. Worley, M. D. Tuscan, and J. W. Harbour, "An accurate, clinically feasible multi-gene expression assay for predicting metastasis in uveal melanoma," *J. Mol. Diagnostics*, vol. 12, no. 4, pp. 461–468, 2010.
- [174] R. Treisman, "Regulation of transcription by MAP kinase cascades.," *Curr. Opin. Cell Biol.*, vol. 8, no. 2, pp. 205–15, 1996.
- [175] C. D. Van Raamsdonk, K. G. Griewank, M. B. Crosby, M. C. Garrido, S. Vemula, T. Wiesner, A. C. Obenauf, W. Wackernagel, G. Green, N. Bouvier, M. M. Sozen, G. Baimukanova, R. Roy, A. Heguy, I. Dolgalev, R. Khanin, K. Busam, M. R. Speicher, J. O'Brien, and B. C. Bastian, "Mutations in *GNA11* in Uveal Melanoma," *N. Engl. J. Med.*, vol. 363, no. 23, pp. 2191–2199, 2010.
- [176] M. D. Onken, L. A. Worley, M. D. Long, S. Duan, M. L. Council, A. M. Bowcock, and J. W. Harbour, "Oncogenic Mutations in *GNAQ* Occur Early in Uveal Melanoma," *Investig. Ophthalmology Vis. Sci.*, vol. 49, no. 12, p. 5230, 2008.
- [177] C. D. Van Raamsdonk, K. R. Fitch, H. Fuchs, M. H. de Angelis, and G. S. Barsh, "Effects of G-protein mutations on skin color," *Nat. Genet.*, vol. 36, no. 9, pp. 961–968, 2004.
- [178] J. Bauer, E. Kilic, J. Vaarwater, B. C. Bastian, C. Garbe, and A. De Klein, "Oncogenic *GNAQ* mutations are not correlated with disease-free survival in uveal melanoma," *Br. J. Cancer*, vol. 101, no. 5, pp. 813–815, 2009.
- [179] A. Weber, U. R. Hengge, D. Urbanik, A. Markwart, A. Mirmohammadsaegh, M. B. Reichel, C. Wittekind, P. Wiedemann, and A. Tannapfel, "Absence of mutations of the *BRAF* gene and constitutive activation of extracellular-regulated kinase in malignant melanomas of the uvea.," *Lab. Invest.*, vol. 83, no. 12, pp. 1771–6, 2003.
- [180] W. Zuidervaart, F. Van Nieuwpoort, M. Stark, R. Dijkman, L. Packer, A. M. Borgstein, S. Pavey, P. Van Der Velden, C. Out, M. J. Jager, N. K. Hayward, and N. A. Gruis, "Activation of the MAPK pathway is a common event in uveal melanomas although it rarely occurs through mutation of *BRAF* or *RAS*," *Br. J. Cancer*, vol. 92, no. 11, pp. 2032–2038, 2005.
- [181] F. Henriquez, C. Janssen, E. G. Kemp, and F. Roberts, "The T1799A *BRAF* Mutation Is Present in Iris Melanoma," *Investig. Ophthalmology Vis. Sci.*, vol. 48, no. 11, p. 4897, 2007.
- [182] A. Calipel, F. Mouriaux, A.-L. Glotin, F. Malecaze, A.-M. Faussat, and F. Mascarelli, "Extracellular Signal-regulated Kinase-dependent Proliferation Is Mediated through the Protein Kinase A/B-Raf Pathway in Human Uveal Melanoma Cells," *J. Biol. Chem.*, vol. 281, no. 14, pp. 9238–9250, 2006.
- [183] X. Chen, Q. Wu, P. Depeille, P. Chen, S. Thornton, H. Kalirai, S. E. Coupland, J. P. Roose, and B. C. Bastian, "RasGRP3 Mediates MAPK Pathway Activation in *GNAQ* Mutant Uveal Melanoma," *Cancer Cell*, vol. 31, no. 5, p. 685–696.e6, 2017.
- [184] P. Johansson, L. G. Aoude, K. Wadt, W. J. Glasson, S. K. Warriar, A. W. Hewitt, J. F. Kiilgaard, S.

Bibliographie

- Heegaard, T. Isaacs, M. Franchina, C. Ingvar, T. Vermeulen, K. J. Whitehead, C. W. Schmidt, J. M. Palmer, J. Symmons, A.-M. Gerdes, G. Jönsson, and N. K. Hayward, "Deep sequencing of uveal melanoma identifies a recurrent mutation in *PLCB4*," *Oncotarget*, vol. 7, no. 4, pp. 4624–31, 2016.
- [185] A. R. Moore, E. Ceraudo, J. J. Sher, Y. Guan, A. N. Shoushtari, M. T. Chang, J. Q. Zhang, E. G. Walczak, M. A. Kazmi, B. S. Taylor, T. Huber, P. Chi, T. P. Sakmar, and Y. Chen, "Recurrent activating mutations of G-protein-coupled receptor *CYSLTR2* in uveal melanoma," *Nat. Genet.*, vol. 48, no. 6, pp. 675–680, 2016.
- [186] F.-X. Yu and K.-L. Guan, "The Hippo pathway: regulators and regulations," *Genes Dev.*, vol. 27, no. 4, pp. 355–371, 2013.
- [187] S. W. Chan, C. J. Lim, K. Guo, C. P. Ng, I. Lee, W. Hunziker, Q. Zeng, and W. Hong, "A Role for TAZ in Migration, Invasion, and Tumorigenesis of Breast Cancer Cells," *Cancer Res.*, vol. 68, no. 8, pp. 2592–2598, 2008.
- [188] A. A. Steinhardt, M. F. Gayyed, A. P. Klein, J. Dong, A. Maitra, D. Pan, E. A. Montgomery, and R. A. Anders, "Expression of Yes-associated protein in common solid tumors," *Hum. Pathol.*, vol. 39, no. 11, pp. 1582–1589, 2008.
- [189] B. Zhao, X. Wei, W. Li, R. S. Udan, Q. Yang, J. Kim, J. Xie, T. Ikenoue, J. Yu, L. Li, P. Zheng, K. Ye, A. Chinnaiyan, G. Halder, Z.-C. Lai, and K.-L. Guan, "Inactivation of YAP oncoprotein by the Hippo pathway is involved in cell contact inhibition and tissue growth control," *Genes Dev.*, vol. 21, no. 21, pp. 2747–2761, 2007.
- [190] F.-X. Yu, B. Zhao, N. Panupinthu, J. L. Jewell, I. Lian, L. H. Wang, J. Zhao, H. Yuan, K. Tumaneng, H. Li, X.-D. Fu, G. B. Mills, and K.-L. Guan, "Regulation of the Hippo-YAP Pathway by G-Protein-Coupled Receptor Signaling," *Cell*, vol. 150, no. 4, pp. 780–791, 2012.
- [191] F.-X. Yu, J. Luo, J.-S. Mo, G. Liu, Y. C. Kim, Z. Meng, L. Zhao, G. Peyman, H. Ouyang, W. Jiang, J. Zhao, X. Chen, L. Zhang, C.-Y. Wang, B. C. Bastian, K. Zhang, and K.-L. Guan, "Mutant Gq/11 Promote Uveal Melanoma Tumorigenesis by Activating YAP," *Cancer Cell*, vol. 25, no. 6, pp. 822–830, 2014.
- [192] X. Feng, M. S. Degese, R. Iglesias-Bartolome, J. P. Vaque, A. A. Molinolo, M. Rodrigues, M. R. Zaidi, B. R. Ksander, G. Merlino, A. Sodhi, Q. Chen, and J. S. Gutkind, "Hippo-Independent Activation of YAP by the GNAQ Uveal Melanoma Oncogene through a Trio-Regulated Rho GTPase Signaling Circuitry," *Cancer Cell*, vol. 25, no. 6, pp. 831–845, 2014.
- [193] H. Dudek, S. R. Datta, T. F. Franke, M. J. Birnbaum, R. Yao, G. M. Cooper, R. A. Segal, D. R. Kaplan, and M. E. Greenberg, "Regulation of neuronal survival by the serine-threonine protein kinase Akt," *Science*, vol. 275, no. 5300, pp. 661–5, 1997.
- [194] E. Y. Skolnik, B. Margolis, M. Mohammadi, E. Lowenstein, R. Fischer, A. Drepps, A. Ullrich, and J. Schlessinger, "Cloning of PI3 kinase-associated p85 utilizing a novel method for expression/cloning of target proteins for receptor tyrosine kinases.," *Cell*, vol. 65, no. 1, pp. 83–90, 1991.
- [195] J. K. Liao, T. Simoncini, A. Hafezi-Moghadam, D. P. Brazil, K. Ley, and W. W. Chin, "Interaction of oestrogen receptor with the regulatory subunit of phosphatidylinositol-3-OH kinase.," *Nature*,

- vol. 407, no. 6803, pp. 538–541, 2000.
- [196] N. Babchia, A. Calipel, F. Mouriaux, A.-M. Faussat, and F. Mascarelli, “The PI3K/Akt and mTOR/P70S6K Signaling Pathways in Human Uveal Melanoma Cells: Interaction with B-Raf/ERK,” *Investig. Ophthalmology Vis. Sci.*, vol. 51, no. 1, p. 421, 2010.
- [197] V. S. Saraiva, A. L. Caissie, L. Segal, C. Edelstein, and M. N. Burnier, “Immunohistochemical expression of phospho-Akt in uveal melanoma,” *Melanoma Res.*, vol. 15, no. 4, pp. 245–50, 2005.
- [198] M. H. Abdel-Rahman, Y. Yang, X.-P. Zhou, E. L. Craig, F. H. Davidorf, and C. Eng, “High Frequency of Submicroscopic Hemizygous Deletion Is a Major Mechanism of Loss of Expression of *PTEN* in Uveal Melanoma,” *J. Clin. Oncol.*, vol. 24, no. 2, pp. 288–295, 2006.
- [199] L. C. Cantley and B. G. Neel, “New insights into tumor suppression: PTEN suppresses tumor formation by restraining the phosphoinositide 3-kinase/AKT pathway,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 96, no. 8, pp. 4240–5, 1999.
- [200] P. L. Dahia, R. C. Aguiar, J. Alberta, J. B. Kum, S. Caron, H. Sill, D. J. Marsh, J. Ritz, A. Freedman, C. Stiles, and C. Eng, “PTEN is inversely correlated with the cell survival factor Akt/PKB and is inactivated via multiple mechanisms in haematological malignancies,” *Hum. Mol. Genet.*, vol. 8, no. 2, pp. 185–93, 1999.
- [201] K. E. O’Reilly, F. Rojo, Q.-B. She, D. Solit, G. B. Mills, D. Smith, H. Lane, F. Hofmann, D. J. Hicklin, D. L. Ludwig, J. Baselga, and N. Rosen, “mTOR Inhibition Induces Upstream Receptor Tyrosine Kinase Signaling and Activates Akt,” *Cancer Res.*, vol. 66, no. 3, pp. 1500–1508, 2006.
- [202] X. Wan, B. Harkavy, N. Shen, P. Grohar, and L. J. Helman, “Rapamycin induces feedback activation of Akt signaling through an IGF-1R-dependent mechanism,” *Oncogene*, vol. 26, no. 13, pp. 1932–1940, 2007.
- [203] Q. Zhu, G. M. Pao, A. M. Huynh, H. Suh, N. Tonnu, P. M. Nederlof, F. H. Gage, and I. M. Verma, “BRCA1 tumour suppression occurs via heterochromatin-mediated silencing,” *Nature*, vol. 477, no. 7363, pp. 179–184, 2011.
- [204] Y. J. Machida, Y. Machida, A. A. Vashisht, J. A. Wohlschlegel, and A. Dutta, “The Deubiquitinating Enzyme BAP1 Regulates Cell Growth via Interaction with HCF-1,” *J. Biol. Chem.*, vol. 284, no. 49, pp. 34179–34188, 2009.
- [205] S. Misaghi, S. Ottosen, A. Izrael-Tomasevic, D. Arnott, M. Lamkanfi, J. Lee, J. Liu, K. O’Rourke, V. M. Dixit, and A. C. Wilson, “Association of C-Terminal Ubiquitin Hydrolase BRCA1-Associated Protein 1 with Cell Cycle Regulator Host Cell Factor 1,” *Mol. Cell. Biol.*, vol. 29, no. 8, pp. 2181–2192, 2009.
- [206] Z. M. Eletr and K. D. Wilkinson, “An Emerging Model for BAP1’s Role in Regulating Cell Cycle Progression,” *Cell Biochem. Biophys.*, vol. 60, no. 1–2, pp. 3–11, 2011.
- [207] H. Nishikawa, W. Wu, A. Koike, R. Kojima, H. Gomi, M. Fukuda, and T. Ohta, “BRCA1-Associated Protein 1 Interferes with BRCA1/BARD1 RING Heterodimer Activity,” *Cancer Res.*, vol. 69, no. 1, pp. 111–119, 2009.
- [208] J. C. Scheuermann, A. G. de Ayala Alonso, K. Oktaba, N. Ly-Hartig, R. K. McGinty, S. Fraterman, M.

- Wilm, T. W. Muir, and J. Müller, "Histone H2A deubiquitinase activity of the Polycomb repressive complex PR-DUB," *Nature*, vol. 465, no. 7295, pp. 243–247, 2010.
- [209] J. W. Harbour, M. D. Onken, E. D. O. Roberson, S. Duan, L. Cao, L. A. Worley, M. L. Council, K. A. Matatall, C. Helms, and A. M. Bowcock, "Frequent Mutation of BAP1 in Metastasizing Uveal Melanomas," *Science (80-.)*, vol. 330, no. 6009, pp. 1410–1413, 2010.
- [210] A. G. Robertson, J. Shih, C. Yau, E. A. Gibb, J. Oba, K. L. Mungall, J. M. Hess, V. Uzunangelov, V. Walter, L. Danilova, T. M. Lichtenberg, M. Kucherlapati, P. K. Kimes, M. Tang, A. Penson, O. Babur, R. Akbani, C. A. Bristow, K. A. Hoadley, L. Iype, M. T. Chang, M. H. Abdel-Rahman, R. Akbani, A. Ally, J. T. Auman, O. Babur, M. Balasundaram, S. Balu, C. Benz, R. Beroukhim, I. Birol, T. Bodenheimer, J. Bowen, R. Bowlby, C. A. Bristow, D. Brooks, R. Carlsen, C. M. Cebulla, M. T. Chang, A. D. Cherniack, L. Chin, J. Cho, E. Chuah, S. Chudamani, C. Cibulskis, K. Cibulskis, L. Cope, S. E. Coupland, L. Danilova, T. Defreitas, J. A. Demchok, L. Desjardins, N. Dhalla, B. Esmaeli, I. Felau, M. L. Ferguson, S. Frazer, S. B. Gabriel, J. M. Gastier-Foster, N. Gehlenborg, M. Gerken, J. E. Gershenwald, G. Getz, E. A. Gibb, K. G. Griewank, E. A. Grimm, D. N. Hayes, A. M. Hegde, D. I. Heiman, C. Helsel, J. M. Hess, K. A. Hoadley, S. Hobensack, R. A. Holt, A. P. Hoyle, X. Hu, C. M. Hutter, M. J. Jager, S. R. Jefferys, C. D. Jones, S. J. M. Jones, C. Kandoth, K. Kasaian, J. Kim, P. K. Kimes, M. Kucherlapati, R. Kucherlapati, E. Lander, M. S. Lawrence, A. J. Lazar, S. Lee, K. M. Leraas, T. M. Lichtenberg, P. Lin, J. Liu, W. Liu, L. Lolla, Y. Lu, L. Iype, Y. Ma, H. S. Mahadeshwar, O. Mariani, M. A. Marra, M. Mayo, S. Meier, S. Meng, M. Meyerson, P. A. Mieczkowski, G. B. Mills, R. A. Moore, L. E. Mose, A. J. Mungall, K. L. Mungall, B. A. Murray, R. Naresh, M. S. Noble, J. Oba, A. Pantazi, M. Parfenov, P. J. Park, J. S. Parker, A. Penson, C. M. Perou, T. Pihl, R. Pilarski, A. Protopopov, A. Radenbaugh, K. Rai, N. C. Ramirez, X. Ren, S. M. Reynolds, J. Roach, A. G. Robertson, S. Roman-Roman, J. Roszik, S. Sadeghi, G. Saksena, X. Sastre, D. Schadendorf, J. E. Schein, L. Schoenfield, S. E. Schumacher, J. Seidman, S. Seth, G. Sethi, M. Sheth, Y. Shi, C. Shields, J. Shih, I. Shmulevich, J. V. Simons, A. D. Singh, P. Sipahimalani, T. Skelly, H. Sofia, M. G. Soloway, X. Song, M.-H. Stern, J. Stuart, Q. Sun, H. Sun, A. Tam, D. Tan, M. Tang, J. Tang, R. Tarnuzzer, B. S. Taylor, N. Thiessen, V. Thorsson, K. Tse, V. Uzunangelov, U. Veluvolu, R. G. W. Verhaak, D. Voet, V. Walter, Y. Wan, Z. Wang, J. N. Weinstein, M. D. Wilkerson, M. D. Williams, L. Wise, S. E. Woodman, T. Wong, Y. Wu, L. Yang, L. Yang, C. Yau, J. C. Zenklusen, J. Zhang, H. Zhang, E. Zmuda, A. D. Cherniack, C. Benz, G. B. Mills, R. G. W. Verhaak, K. G. Griewank, I. Felau, J. C. Zenklusen, J. E. Gershenwald, L. Schoenfield, A. J. Lazar, M. H. Abdel-Rahman, S. Roman-Roman, M.-H. Stern, C. M. Cebulla, M. D. Williams, M. J. Jager, S. E. Coupland, B. Esmaeli, C. Kandoth, and S. E. Woodman, "Integrative Analysis Identifies Four Molecular and Clinical Subsets in Uveal Melanoma," *Cancer Cell*, vol. 32, no. 2, p. 204–220.e15, 2017.
- [211] H. Yu, N. Mashtalir, S. Daou, I. Hammond-Martel, J. Ross, G. Sui, G. W. Hart, F. J. Rauscher, E. Drobetsky, E. Milot, Y. Shi, and E. B. Affar, "The Ubiquitin Carboxyl Hydrolase BAP1 Forms a Ternary Complex with YY1 and HCF-1 and Is a Critical Regulator of Gene Expression," *Mol. Cell Biol.*, vol. 30, no. 21, pp. 5071–5085, 2010.
- [212] G. D. te Raa, I. A. M. Derks, V. Navrkalova, A. Skowronska, P. D. Moerland, J. van Laar, C. Oldreive, H. Monsuur, M. Trbusek, J. Malcikova, M. Lodén, C. H. Geisler, J. Hüllelein, A. Jethwa, T. Zenz, S. Pospisilova, T. Stankovic, M. H. J. van Oers, A. P. Kater, and E. Eldering, "The impact of SF3B1 mutations in CLL on the DNA-damage response," *Leukemia*, vol. 29, no. 5, pp. 1133–1142, 2015.
- [213] C. L. Decatur, E. Ong, N. Garg, H. Anbunathan, A. M. Bowcock, M. G. Field, and J. W. Harbour, "Driver Mutations in Uveal Melanoma," *JAMA Ophthalmol.*, vol. 134, no. 7, p. 728, 2016.

- [214] J. W. Harbour, E. D. O. Roberson, H. Anbunathan, M. D. Onken, L. A. Worley, and A. M. Bowcock, "Recurrent mutations at codon 625 of the splicing factor SF3B1 in uveal melanoma," *Nat. Genet.*, vol. 45, no. 2, pp. 133–135, 2013.
- [215] K. Yoshida, M. Sanada, Y. Shiraishi, D. Nowak, Y. Nagata, R. Yamamoto, Y. Sato, A. Sato-Otsubo, A. Kon, M. Nagasaki, G. Chalkidis, Y. Suzuki, M. Shiosaka, R. Kawahata, T. Yamaguchi, M. Otsu, N. Obara, M. Sakata-Yanagimoto, K. Ishiyama, H. Mori, F. Nolte, W.-K. Hofmann, S. Miyawaki, S. Sugano, C. Haferlach, H. P. Koeffler, L.-Y. Shih, T. Haferlach, S. Chiba, H. Nakauchi, S. Miyano, and S. Ogawa, "Frequent pathway mutations of splicing machinery in myelodysplasia," *Nature*, vol. 478, no. 7367, pp. 64–69, 2011.
- [216] V. Quesada, L. Conde, N. Villamor, G. R. Ordóñez, P. Jares, L. Bassaganyas, A. J. Ramsay, S. Beà, M. Pinyol, A. Martínez-Trillos, M. López-Guerra, D. Colomer, A. Navarro, T. Baumann, M. Aymerich, M. Rozman, J. Delgado, E. Giné, J. M. Hernández, M. González-Díaz, D. A. Puente, G. Velasco, J. M. P. Freije, J. M. C. Tubío, R. Royo, J. L. Gelpí, M. Orozco, D. G. Pisano, J. Zamora, M. Vázquez, A. Valencia, H. Himmelbauer, M. Bayés, S. Heath, M. Gut, I. Gut, X. Estivill, A. López-Guillermo, X. S. Puente, E. Campo, and C. López-Otín, "Exome sequencing identifies recurrent mutations of the splicing factor SF3B1 gene in chronic lymphocytic leukemia," *Nat. Genet.*, vol. 44, no. 1, pp. 47–52, 2012.
- [217] S. Yavuzigitoglu, A. E. Koopmans, R. M. Verdijk, J. Vaarwater, B. Eussen, A. van Bodegom, D. Paridaens, E. Kiliç, A. de Klein, and Rotterdam Ocular Melanoma Study Group, "Uveal Melanomas with SF3B1 Mutations," *Ophthalmology*, vol. 123, no. 5, pp. 1118–1128, 2016.
- [218] M. Martin, L. Maßhöfer, P. Temming, S. Rahmann, C. Metz, N. Bornfeld, J. van de Nes, L. Klein-Hitpass, A. G. Hinnebusch, B. Horsthemke, D. R. Lohmann, and M. Zeschnigk, "Exome sequencing identifies recurrent somatic mutations in EIF1AX and SF3B1 in uveal melanoma with disomy 3," *Nat. Genet.*, vol. 45, no. 8, pp. 933–936, 2013.
- [219] R. D. Carvajal, G. K. Schwartz, T. Tezel, B. Marr, J. H. Francis, and P. D. Nathan, "Metastatic disease from uveal melanoma: Treatment options and future prospects," *Br. J. Ophthalmol.*, vol. 101, no. 1, pp. 38–44, 2017.
- [220] J. L. Battiste, T. V Pestova, C. U. Hellen, and G. Wagner, "The eIF1A solution structure reveals a large RNA-binding surface important for scanning function.," *Mol. Cell*, vol. 5, no. 1, pp. 109–19, 2000.
- [221] C. A. Fekete, D. J. Applefield, S. A. Blakely, N. Shirokikh, T. Pestova, J. R. Lorsch, and A. G. Hinnebusch, "The eIF1A C-terminal domain promotes initiation complex assembly, scanning and AUG selection in vivo," *EMBO J.*, vol. 24, no. 20, pp. 3588–3601, 2005.
- [222] A. G. Robertson, J. Shih, C. Yau, E. A. Gibb, J. Oba, K. L. Mungall, J. M. Hess, V. Uzunangelov, V. Walter, L. Danilova, T. M. Lichtenberg, M. Kucherlapati, P. K. Kimes, M. Tang, A. Penson, O. Babur, R. Akbani, C. A. Bristow, K. A. Hoadley, L. Iype, M. T. Chang, M. H. Abdel-Rahman, R. Akbani, A. Ally, J. T. Auman, O. Babur, M. Balasundaram, S. Balu, C. Benz, R. Beroukhir, I. Birol, T. Bodenheimer, J. Bowen, R. Bowlby, C. A. Bristow, D. Brooks, R. Carlsen, C. M. Cebulla, M. T. Chang, A. D. Cherniack, L. Chin, J. Cho, E. Chuah, S. Chudamani, C. Cibulskis, K. Cibulskis, L. Cope, S. E. Coupland, L. Danilova, T. Defreitas, J. A. Demchok, L. Desjardins, N. Dhalla, B. Esmali, I. Felau, M. L. Ferguson, S. Frazer, S. B. Gabriel, J. M. Gastier-Foster, N. Gehlenborg, M. Gerken, J. E. Gershenwald, G. Getz, E. A. Gibb, K. G. Griewank, E. A. Grimm, D. N. Hayes, A. M. Hegde, D. I.

- Heiman, C. Helsel, J. M. Hess, K. A. Hoadley, S. Hobensack, R. A. Holt, A. P. Hoyle, X. Hu, C. M. Hutter, M. J. Jager, S. R. Jefferys, C. D. Jones, S. J. M. Jones, C. Kandoth, K. Kasaian, J. Kim, P. K. Kimes, M. Kucherlapati, R. Kucherlapati, E. Lander, M. S. Lawrence, A. J. Lazar, S. Lee, K. M. Leraas, T. M. Lichtenberg, P. Lin, J. Liu, W. Liu, L. Lolla, Y. Lu, L. Iype, Y. Ma, H. S. Mahadeshwar, O. Mariani, M. A. Marra, M. Mayo, S. Meier, S. Meng, M. Meyerson, P. A. Mieczkowski, G. B. Mills, R. A. Moore, L. E. Mose, A. J. Mungall, K. L. Mungall, B. A. Murray, R. Naresh, M. S. Noble, J. Oba, A. Pantazi, M. Parfenov, P. J. Park, J. S. Parker, A. Penson, C. M. Perou, T. Pihl, R. Pilarski, A. Protopopov, A. Radenbaugh, K. Rai, N. C. Ramirez, X. Ren, S. M. Reynolds, J. Roach, A. G. Robertson, S. Roman-Roman, J. Roszik, S. Sadeghi, G. Saksena, X. Sastre, D. Schadendorf, J. E. Schein, L. Schoenfield, S. E. Schumacher, J. Seidman, S. Seth, G. Sethi, M. Sheth, Y. Shi, C. Shields, J. Shih, I. Shmulevich, J. V. Simons, A. D. Singh, P. Sipahimalani, T. Skelly, H. Sofia, M. G. Soloway, X. Song, M. H. Stern, J. Stuart, Q. Sun, H. Sun, A. Tam, D. Tan, M. Tang, J. Tang, R. Tarnuzzer, B. S. Taylor, N. Thiessen, V. Thorsson, K. Tse, V. Uzunangelov, U. Veluvolu, R. G. W. Verhaak, D. Voet, V. Walter, Y. Wan, Z. Wang, J. N. Weinstein, M. D. Wilkerson, M. D. Williams, L. Wise, S. E. Woodman, T. Wong, Y. Wu, L. Yang, L. Yang, C. Yau, J. C. Zenklusen, J. Zhang, H. Zhang, E. Zmuda, A. D. Cherniack, C. Benz, G. B. Mills, R. G. W. Verhaak, K. G. Griewank, I. Felau, J. C. Zenklusen, J. E. Gershenwald, L. Schoenfield, A. J. Lazar, M. H. Abdel-Rahman, S. Roman-Roman, M. H. Stern, C. M. Cebulla, M. D. Williams, M. J. Jager, S. E. Coupland, B. Esmaeli, C. Kandoth, and S. E. Woodman, "Integrative Analysis Identifies Four Molecular and Clinical Subsets in Uveal Melanoma," *Cancer Cell*, vol. 32, no. 2, p. 204–220.e15, 2017.
- [223] M. G. Field, C. L. Decatur, S. Kurtenbach, G. Gezgin, P. A. van der Velden, M. J. Jager, K. N. Kozak, and J. W. Harbour, "PRAME as an Independent Biomarker for Metastasis in Uveal Melanoma," *Clin. Cancer Res.*, vol. 22, no. 5, pp. 1234–42, 2016.
- [224] M. G. Field, M. A. Durante, C. L. Decatur, B. Tarlan, K. M. Oelschlager, J. F. Stone, J. Kuznetsov, A. M. Bowcock, S. Kurtenbach, and J. W. Harbour, "Epigenetic reprogramming and aberrant expression of PRAME are associated with increased metastatic risk in Class 1 and Class 2 uveal melanomas," *Oncotarget*, vol. 7, no. 37, pp. 59209–59219, 2016.
- [225] D. Reichstein, "New concepts in the molecular understanding of uveal melanoma," *Curr. Opin. Ophthalmol.*, vol. 28, no. 3, pp. 219–227, 2017.
- [226] M. G. Field, M. A. Durante, H. Anbunathan, L. Z. Cai, C. L. Decatur, A. M. Bowcock, S. Kurtenbach, and J. W. Harbour, "Punctuated evolution of canonical genomic aberrations in uveal melanoma," *Nat. Commun.*, vol. 9, no. 1, 2018.
- [227] Q. Pang, J. Ge, Y. Shao, W. Sun, H. Song, T. Xia, B. Xiao, and J. Guo, "Increased expression of long intergenic non-coding RNA LINC00152 in gastric cancer and its clinical significance," *Tumor Biol.*, vol. 35, no. 6, pp. 5441–5447, 2014.
- [228] T. Colombo, L. Farina, G. Macino, and P. Paci, "PVT1: A Rising Star among Oncogenic Long Noncoding RNAs," *Biomed Res. Int.*, vol. 2015, pp. 1–10, 2015.
- [229] K. Mallikarjuna, V. Pushparaj, J. Biswas, and S. Krishnakumar, "Expression of Epidermal Growth Factor Receptor, Ezrin, Hepatocyte Growth Factor, and c-Met in Uveal Melanoma: An Immunohistochemical Study," *Curr. Eye Res.*, vol. 32, no. 3, pp. 281–290, 2007.
- [230] C. All-Ericsson, L. Girnita, A. Müller-Brunotte, B. Brodin, S. Seregard, A. Ostman, and O. Larsson, "c-Kit-dependent growth of uveal melanoma cells: a potential therapeutic target?," *Invest.*

- Ophthalmol. Vis. Sci.*, vol. 45, no. 7, pp. 2075–82, 2004.
- [231] H. Xu, L. P. Stabile, C. T. Gubish, W. E. Gooding, J. R. Grandis, and J. M. Siegfried, “Dual Blockade of EGFR and c-Met Abrogates Redundant Signaling and Proliferation in Head and Neck Carcinoma Cells,” *Clin. Cancer Res.*, vol. 17, no. 13, pp. 4425–4438, 2011.
- [232] X. Wu, J. Zhou, A. M. Rogers, P. A. Jänne, E. Benedettini, M. Loda, and F. S. Hodi, “c-Met, epidermal growth factor receptor, and insulin-like growth factor-1 receptor are important for growth in uveal melanoma and independently contribute to migration and metastatic potential,” *Melanoma Res.*, vol. 22, no. 2, pp. 123–132, 2012.
- [233] M. E. Valsecchi, M. Orloff, R. Sato, I. Chervoneva, C. L. Shields, J. A. Shields, M. J. Mastrangelo, and T. Sato, “Adjuvant Sunitinib in High-Risk Patients with Uveal Melanoma,” *Ophthalmology*, vol. 125, no. 2, pp. 210–217, 2018.
- [234] S. Landreville, O. A. Agapova, K. A. Matatall, Z. T. Kneass, M. D. Onken, R. S. Lee, A. M. Bowcock, and J. W. Harbour, “Histone Deacetylase Inhibitors Induce Growth Arrest and Differentiation in Uveal Melanoma,” *Clin. Cancer Res.*, vol. 18, no. 2, pp. 408–416, 2012.
- [235] X. Guan, H. Wang, F. Ma, H. Qian, Z. Yi, and B. Xu, “The Efficacy and Safety of Programmed Cell Death 1 and Programmed Cell Death 1 Ligand Inhibitors for Advanced Melanoma,” *Medicine (Baltimore)*, vol. 95, no. 11, p. e3134, 2016.
- [236] G. Bossi, S. Buisson, J. Oates, B. K. Jakobsen, and N. J. Hassan, “ImmTAC-redirectioned tumour cell killing induces and potentiates antigen cross-presentation by dendritic cells,” *Cancer Immunol. Immunother.*, vol. 63, no. 5, pp. 437–448, 2014.
- [237] I. Márquez-Rodas, P. Cerezuela, A. Soria, A. Berrocal, A. Riso, M. González-Cao, and S. Martín-Algarra, “Immune checkpoint inhibitors: therapeutic advances in melanoma,” *Ann. Transl. Med.*, vol. 3, no. 18, p. 267, 2015.
- [238] L. D. Rothermel, A. C. Sabesan, D. J. Stephens, S. S. Chandran, B. C. Paria, A. K. Srivastava, R. Somerville, J. R. Wunderlich, C.-C. R. Lee, L. Xi, T. H. Pham, M. Raffeld, P. Jailwala, M. Kasoji, and U. S. Kammula, “Identification of an Immunogenic Subset of Metastatic Uveal Melanoma,” *Clin. Cancer Res.*, vol. 22, no. 9, pp. 2237–2249, 2016.
- [239] G. Gezgin, S. J. Luk, J. Cao, M. Dogrusöz, D. M. van der Steen, R. S. Hagedoorn, D. Krijgsman, P. A. van der Velden, M. G. Field, G. P. M. Luyten, K. Szuhai, J. W. Harbour, E. S. Jordanova, M. H. M. Heemskerk, and M. J. Jager, “PRAME as a Potential Target for Immunotherapy in Metastatic Uveal Melanoma,” *JAMA Ophthalmol.*, vol. 135, no. 6, p. 541, 2017.
- [240] R. D. Carvajal, J. A. Sosman, J. F. Quevedo, M. M. Milhem, A. M. Joshua, R. R. Kudchadkar, G. P. Linette, T. F. Gajewski, J. Lutzky, D. H. Lawson, C. D. Lao, P. J. Flynn, M. R. Albertini, T. Sato, K. Lewis, A. Doyle, K. Ancell, K. S. Panageas, M. Bluth, C. Hedvat, J. Erinjeri, G. Ambrosini, B. Marr, D. H. Abramson, M. A. Dickson, J. D. Wolchok, P. B. Chapman, and G. K. Schwartz, “Effect of Selumetinib vs Chemotherapy on Progression-Free Survival in Uveal Melanoma,” *JAMA*, vol. 311, no. 23, p. 2397, 2014.
- [241] G. S. Falchook, K. D. Lewis, J. R. Infante, M. S. Gordon, N. J. Vogelzang, D. J. DeMarini, P. Sun, C. Moy, S. A. Szabo, L. T. Roadcap, V. G. Peddareddigari, P. F. Lebowitz, N. T. Le, H. A. Burris, W. A. Messersmith, P. J. O’Dwyer, K. B. Kim, K. Flaherty, J. C. Bendell, R. Gonzalez, R. Kurzrock, and L. A.

Bibliographie

- Fecher, "Activity of the oral MEK inhibitor trametinib in patients with advanced melanoma: a phase 1 dose-escalation trial," *Lancet Oncol.*, vol. 13, no. 8, pp. 782–789, 2012.
- [242] G. Ambrosini, E. Musi, A. L. Ho, E. de Stanchina, and G. K. Schwartz, "Inhibition of Mutant GNAQ Signaling in Uveal Melanoma Induces AMPK-Dependent Autophagic Cell Death," *Mol. Cancer Ther.*, vol. 12, no. 5, pp. 768–776, 2013.
- [243] E. Musi, G. Ambrosini, E. de Stanchina, and G. K. Schwartz, "The Phosphoinositide 3-Kinase Selective Inhibitor BYL719 Enhances the Effect of the Protein Kinase C Inhibitor AEB071 in GNAQ/GNA11-Mutant Uveal Melanoma Cells," *Mol. Cancer Ther.*, vol. 13, no. 5, pp. 1044–1053, 2014.
- [244] G. Carita, E. Frisch-Dit-Leitz, A. Dahmani, C. Raymondie, N. Cassoux, S. Piperno-Neumann, F. Némati, C. Laurent, L. De Koning, E. Halilovic, S. Jeay, A. Wylie, C. Emery, S. Roman-Roman, M. Schoumacher, and D. Decaudin, "Dual inhibition of protein kinase C and p53-MDM2 or PKC and mTORC1 are novel efficient therapeutic approaches for uveal melanoma," *Oncotarget*, vol. 7, no. 23, pp. 33542–56, 2016.
- [245] S. Bhatia, J. Moon, K. A. Margolin, J. S. Weber, C. D. Lao, M. Othus, A. M. Aparicio, A. Ribas, and V. K. Sondak, "Phase II Trial of Sorafenib in Combination with Carboplatin and Paclitaxel in Patients with Metastatic Uveal Melanoma: SWOG S0512," *PLoS One*, vol. 7, no. 11, p. e48787, 2012.
- [246] N. Herlihy, M. Dogrusoz, T. H. van Essen, J. W. Harbour, P. A. van der Velden, M. C. J. A. van Eggermond, G. W. Haasnoot, P. J. van den Elsen, and M. J. Jager, "Skewed Expression of the Genes Encoding Epigenetic Modifiers in High-Risk Uveal Melanoma," *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, vol. 56, no. 3, pp. 1447–1458, 2015.
- [247] L. Fu, M. Tian, X. Li, J. Li, J. Huang, L. Ouyang, Y. Zhang, and B. Liu, "Inhibition of BET bromodomains as a therapeutic strategy for cancer drug discovery," *Oncotarget*, vol. 6, no. 8, pp. 5501–16, Mar. 2015.
- [248] P. Filippakopoulos, J. Qi, S. Picaud, Y. Shen, W. B. Smith, O. Fedorov, E. M. Morse, T. Keates, T. T. Hickman, I. Felletar, M. Philpott, S. Munro, M. R. McKeown, Y. Wang, A. L. Christie, N. West, M. J. Cameron, B. Schwartz, T. D. Heightman, N. La Thangue, C. A. French, O. Wiest, A. L. Kung, S. Knapp, and J. E. Bradner, "Selective inhibition of BET bromodomains," *Nature*, vol. 468, no. 7327, pp. 1067–1073, 2010.
- [249] G. Ambrosini, A. D. Sawle, E. Musi, and G. K. Schwartz, "BRD4-targeted therapy induces Myc-independent cytotoxicity in Gnaq/11-mutated uveal melanoma cells," *Oncotarget*, vol. 6, no. 32, pp. 33397–409, 2015.
- [250] A. Alonso, J. Sasin, N. Bottini, I. Friedberg, I. Friedberg, A. Osterman, A. Godzik, T. Hunter, J. Dixon, and T. Mustelin, "Protein Tyrosine Phosphatases in the Human Genome," *Cell*, vol. 117, no. 6, pp. 699–711, 2004.
- [251] D. C. Bessette, D. Qiu, and C. J. Pallen, "PRL PTPs: mediators and markers of cancer progression," *Cancer Metastasis Rev.*, vol. 27, no. 2, pp. 231–252, 2008.
- [252] A. Östman, C. Hellberg, and F. D. Böhmer, "Protein-tyrosine phosphatases and cancer," *Nat. Rev. Cancer*, vol. 6, no. 4, pp. 307–320, 2006.

- [253] P. Rios, X. Li, and M. Köhn, "Molecular mechanisms of the PRL phosphatases.," *FEBS J.*, vol. 280, no. 2, pp. 505–24, 2013.
- [254] M. Montagna, O. Serova, B. S. Sylla, M. G. Mattei, and G. M. Lenoir, "Localization of the human phosphotyrosine phosphatase-related genes (h-PRL-1) to chromosome bands 1p35-p34, 17q12-q21, 11q24-q25 and 12q24.," *Hum. Genet.*, vol. 98, no. 6, pp. 738–40, 1996.
- [255] C. A. Cates, R. L. Michael, K. R. Stayrook, K. A. Harvey, Y. D. Burke, S. K. Randall, P. L. Crowell, and D. N. Crowell, "Prenylation of oncogenic human PTPcaax protein tyrosine phosphatases," *Cancer Lett.*, vol. 110, no. 1–2, pp. 49–55, 1996.
- [256] Q. Zeng, W. Hong, and Y. H. Tan, "Mouse PRL-2 and PRL-3, Two Potentially Prenylated Protein Tyrosine Phosphatases Homologous to PRL-1," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 244, no. 2, pp. 421–427, 1998.
- [257] Q. Zeng, X. Si, H. Horstmann, Y. Xu, W. Hong, and C. J. Pallen, "Prenylation-dependent Association of Protein-tyrosine Phosphatases PRL-1, -2, and -3 with the Plasma Membrane and the Early Endosome," *J. Biol. Chem.*, vol. 275, no. 28, pp. 21444–21452, 2000.
- [258] J. Wang, C. E. Kirby, and R. Herbst, "The Tyrosine Phosphatase PRL-1 Localizes to the Endoplasmic Reticulum and the Mitotic Spindle and Is Required for Normal Mitosis," *J. Biol. Chem.*, vol. 277, no. 48, pp. 46659–46668, 2002.
- [259] L. M. Ooms, K. A. Horan, P. Rahman, G. Seaton, R. Gurung, D. S. Kethesparan, and C. A. Mitchell, "The role of the inositol polyphosphate 5-phosphatases in cellular function and human disease," *Biochem. J.*, vol. 419, no. 1, pp. 29–49, 2009.
- [260] J.-P. Sun, W.-Q. Wang, H. Yang, S. Liu, F. Liang, A. A. Fedorov, S. C. Almo, and Z.-Y. Zhang, "Structure and biochemical properties of PRL-1, a phosphatase implicated in cell growth, differentiation, and tumor invasion.," *Biochemistry*, vol. 44, no. 36, pp. 12009–21, 2005.
- [261] J.-P. Sun, Y. Luo, X. Yu, W.-Q. Wang, B. Zhou, F. Liang, and Z.-Y. Zhang, "Phosphatase Activity, Trimerization, and the C-terminal Polybasic Region Are All Required for PRL1-mediated Cell Growth and Migration," *J. Biol. Chem.*, vol. 282, no. 39, pp. 29043–29051, 2007.
- [262] G. Kozlov, J. Cheng, E. Ziomek, D. Banville, K. Gehring, and I. Ekiel, "Structural Insights into Molecular Function of the Metastasis-associated Phosphatase PRL-3," *J. Biol. Chem.*, vol. 279, no. 12, pp. 11882–11889, 2004.
- [263] M. Pascaru, C. Tanase, A. M. Vacaru, P. Boeti, E. Neagu, I. Popescu, and S. E. Szedlacsek, "Analysis of molecular determinants of PRL-3," *J. Cell. Mol. Med.*, vol. 13, no. 9b, pp. 3141–3150, 2009.
- [264] K.-A. Kim, J.-S. Song, J. Jee, M. R. Sheen, C. Lee, T. G. Lee, S. Ro, J. M. Cho, W. Lee, T. Yamazaki, Y. H. Jeon, and C. Cheong, "Structure of human PRL-3, the phosphatase associated with cancer metastasis," *FEBS Lett.*, vol. 565, no. 1–3, pp. 181–187, 2004.
- [265] D. G. Jeong, S. J. Kim, J. H. Kim, J. H. Son, M. R. Park, S. M. Lim, T.-S. Yoon, and S. E. Ryu, "Trimeric structure of PRL-1 phosphatase reveals an active enzyme conformation and regulation mechanisms," *J. Mol. Biol.*, vol. 345, no. 2, pp. 401–13, 2005.
- [266] J. S. Laurence, K. Hallenga, and C. V. Stauffacher, "Letter to the Editor: ¹H, ¹⁵N, ¹³C Resonance

Bibliographie

- Assignments of the Human Protein Tyrosine Phosphatase PRL-1," *J. Biomol. NMR*, vol. 29, no. 3, pp. 417–418, 2004.
- [267] F. Liang, S. Kumar, and Z.-Y. Zhang, "Proteomic approaches to studying protein tyrosine phosphatases," *Mol. Biosyst.*, vol. 3, no. 5, p. 308, 2007.
- [268] J. P. Sun, W. Q. Wang, H. Yang, S. Liu, F. Liang, A. A. Fedorov, S. C. Almo, and Z. Y. Zhang, "Structure and biochemical properties of PRL-1, a phosphatase implicated in cell growth, differentiation, and tumor invasion," *Biochemistry*, vol. 44, no. 36, pp. 12009–12021, 2005.
- [269] L. Yu, U. Kelly, J. N. Ebricht, G. Malek, P. Saloupis, D. W. Rickman, B. S. McKay, V. Y. Arshavsky, and C. Bowes Rickman, "Oxidative stress-induced expression and modulation of Phosphatase of Regenerating Liver-1 (PRL-1) in mammalian retina," *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.*, vol. 1773, no. 9, pp. 1473–1482, 2007.
- [270] Y. Dong, L. Zhang, Y. Bai, H.-M. Zhou, A. M. Campbell, H. Chen, W. Yong, W. Zhang, Q. Zeng, W. Shou, and Z.-Y. Zhang, "Phosphatase of regenerating liver 2 (PRL2) deficiency impairs Kit signaling and spermatogenesis.," *J. Biol. Chem.*, vol. 289, no. 6, pp. 3799–810, 2014.
- [271] Y. Dong, L. Zhang, S. Zhang, Y. Bai, H. Chen, X. Sun, W. Yong, W. Li, S. C. Colvin, S. J. Rhodes, W. Shou, and Z.-Y. Zhang, "Phosphatase of Regenerating Liver 2 (PRL2) Is Essential for Placental Development by Down-regulating PTEN (Phosphatase and Tensin Homologue Deleted on Chromosome 10) and Activating Akt Protein," *J. Biol. Chem.*, vol. 287, no. 38, pp. 32172–32179, 2012.
- [272] M. Kobayashi, Y. Bai, Y. Dong, H. Yu, S. Chen, R. Gao, L. Zhang, M. C. Yoder, R. Kapur, Z.-Y. Zhang, and Y. Liu, "PRL2/PTP4A2 phosphatase is important for hematopoietic stem cell self-renewal.," *Stem Cells*, vol. 32, no. 7, pp. 1956–67, 2014.
- [273] S. Maacha, N. Planque, C. Laurent, C. Pegoraro, O. Anezo, F. Maczkowiak, A. H. Monsoro-Burq, and S. Saule, "Protein tyrosine phosphatase 4A3 (PTP4A3) is required for *Xenopus laevis* cranial neural crest migration in vivo.," *PLoS One*, vol. 8, no. 12, p. e84717, 2013.
- [274] M. W. Zimmerman, G. E. Homanics, and J. S. Lazo, "Targeted Deletion of the Metastasis-Associated Phosphatase Ptp4a3 (PRL-3) Suppresses Murine Colon Cancer," *PLoS One*, vol. 8, no. 3, p. e58300, 2013.
- [275] R. H. Diamond, D. E. Cressman, T. M. Laz, C. S. Abrams, and R. Taub, "PRL-1, a unique nuclear protein tyrosine phosphatase, affects cell growth.," *Mol. Cell. Biol.*, vol. 14, no. 6, pp. 3752–62, 1994.
- [276] U.-M. Fagerli, R. U. Holt, T. Holien, T. K. Vaatsveen, F. Zhan, K. W. Egeberg, B. Barlogie, A. Waage, H. Aarset, H. Y. Dai, J. D. Shaughnessy, A. Sundan, and M. Borset, "Overexpression and involvement in migration by the metastasis-associated phosphatase PRL-3 in human myeloma cells," *Blood*, vol. 111, no. 2, pp. 806–815, 2008.
- [277] J. J. Fiordalisi, P. J. Keller, and A. D. Cox, "PRL tyrosine phosphatases regulate rho family GTPases to promote invasion and motility.," *Cancer Res.*, vol. 66, no. 6, pp. 3153–61, 2006.
- [278] R. Song, F. Qian, Y.-P. Li, X. Sheng, S.-X. Cao, and Q. Xu, "Phosphatase of Regenerating Liver-3 Localizes to Cyto-Membrane and Is Required for B16F1 Melanoma Cell Metastasis In Vitro and In

- Vivo," *PLoS One*, vol. 4, no. 2, p. e4450, 2009.
- [279] M. Foy, O. Anézo, S. Saule, and N. Planque, "PRL-3 / PTP4A3 phosphatase regulates integrin β 1 in adhesion structures during migration of human ocular melanoma cells," *Exp. Cell Res.*, vol. 353, no. 2, pp. 88–99, 2017.
- [280] R. H. Diamond, C. Peters, S. P. Jung, L. E. Greenbaum, B. A. Haber, D. G. Silberg, P. G. Traber, and R. Taub, "Expression of PRL-1 nuclear PTPase is associated with proliferation in liver but with differentiation in intestine," *Am. J. Physiol. Liver Physiol.*, vol. 271, no. 1, pp. G121–G129, 1996.
- [281] W. Kong, G. P. Swain, S. Li, and R. H. Diamond, "PRL-1 PTPase expression is developmentally regulated with tissue-specific patterns in epithelial tissues," *Am. J. Physiol. Liver Physiol.*, vol. 279, no. 3, pp. G613–G621, Sep. 2000.
- [282] T. O. Yarovinsky, D. W. Rickman, R. H. Diamond, R. Taub, G. S. Hageman, and C. Bowes Rickman, "Expression of the protein tyrosine phosphatase, phosphatase of regenerating liver 1, in the outer segments of primate cone photoreceptors," *Brain Res. Mol. Brain Res.*, vol. 77, no. 1, pp. 95–103, 2000.
- [283] S. Lian, L. Meng, Y. Yang, T. Ma, X. Xing, Q. Feng, Q. Song, C. Liu, Z. Tian, L. Qu, and C. Shou, "PRL-3 promotes telomere deprotection and chromosomal instability," *Nucleic Acids Res.*, vol. 45, no. 11, pp. 6546–6571, 2017.
- [284] Y. Liu, P. Zheng, Y. Liu, T. Ji, X. Liu, S. Yao, X. Cheng, Y. Li, L. Chen, Z. Xiao, J. Zhou, and J. Li, "An epigenetic role for PRL-3 as a regulator of H3K9 methylation in colorectal cancer," *Gut*, vol. 62, no. 4, pp. 571–81, 2013.
- [285] X.-Y. Fang, R. Song, W. Chen, Y.-Y. Yang, Y.-H. Gu, Y.-Q. Shu, X.-D. Wu, X.-F. Wu, Y. Sun, Y. Shen, and Q. Xu, "PRL-3 Promotes the Malignant Progression of Melanoma via Triggering Dephosphorylation and Cytoplasmic Localization of NHERF1," *J. Invest. Dermatol.*, vol. 135, no. 9, pp. 2273–82, 2015.
- [286] S. Takano, H. Fukuyama, M. Fukumoto, J. Kimura, J. H. Xue, H. Ohashi, and J. Fujita, "PRL-1, a protein tyrosine phosphatase, is expressed in neurons and oligodendrocytes in the brain and induced in the cerebral cortex following transient forebrain ischemia," *Brain Res. Mol. Brain Res.*, vol. 40, no. 1, pp. 105–15, 1996.
- [287] Q. Zeng, W. Hong, and Y. H. Tan, "Mouse PRL-2 and PRL-3, Two Potentially Prenylated Protein Tyrosine Phosphatases Homologous to PRL-1," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 244, no. 2, pp. 421–427, 1998.
- [288] D. A. Carter, "Expression of a novel rat protein tyrosine phosphatase gene," *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1442, no. 2–3, pp. 405–8, 1998.
- [289] M. W. Zimmerman, K. E. McQueeney, J. S. Isenberg, B. R. Pitt, K. A. Wasserloos, G. E. Homanics, and J. S. Lazo, "Protein-tyrosine phosphatase 4A3 (PTP4A3) promotes vascular endothelial growth factor signaling and enables endothelial cell motility," *J. Biol. Chem.*, vol. 289, no. 9, pp. 5904–13, 2014.
- [290] C. M. Dumauual, G. E. Sandusky, P. L. Crowell, and S. K. Randall, "Cellular localization of PRL-1 and PRL-2 gene expression in normal adult human tissues," *J. Histochem. Cytochem.*, vol. 54, no. 12,

Bibliographie

- pp. 1401–12, 2006.
- [291] W. F. Matter, T. Estridge, C. Zhang, R. Belagaje, L. Stancato, J. Dixon, B. Johnson, L. Bloem, T. Pickard, M. Donaghue, S. Acton, R. Jeyaseelan, V. Kadambi, and C. J. Vlahos, “Role of PRL-3, a human muscle-specific tyrosine phosphatase, in angiotensin-II signaling.,” *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 283, no. 5, pp. 1061–8, 2001.
- [292] M.-D. Lin, H.-T. Lee, S.-C. Wang, H.-R. Li, H.-L. Hsien, K.-W. Cheng, Y.-D. Chang, M.-L. Huang, J.-K. Yu, and Y.-H. Chen, “Expression of phosphatase of regenerating liver family genes during embryogenesis: an evolutionary developmental analysis among *Drosophila*, amphioxus, and zebrafish,” *BMC Dev. Biol.*, vol. 13, no. 1, p. 18, 2013.
- [293] A. Q. O. Al-Aidaros and Q. Zeng, “PRL-3 phosphatase and cancer metastasis,” *J. Cell. Biochem.*, vol. 111, no. 5, pp. 1087–1098, Dec. 2010.
- [294] D. C. Bessette, D. Qiu, and C. J. Pallen, “PRL PTPs: mediators and markers of cancer progression.,” *Cancer Metastasis Rev.*, vol. 27, no. 2, pp. 231–52, 2008.
- [295] Y. Wang and J. S. Lazo, “Metastasis-associated phosphatase PRL-2 regulates tumor cell migration and invasion,” *Oncogene*, vol. 31, no. 7, pp. 818–827, 2012.
- [296] S. Hardy, N. N. Wong, W. J. Muller, M. Park, and M. L. Tremblay, “Overexpression of the Protein Tyrosine Phosphatase PRL-2 Correlates with Breast Tumor Formation and Progression,” *Cancer Res.*, vol. 70, no. 21, pp. 8959–8967, 2010.
- [297] Y. Wang, Z.-F. Li, J. He, Y.-L. Li, G.-B. Zhu, L.-H. Zhang, and Y.-L. Li, “Expression of the human phosphatases of regenerating liver (PRLs) in colonic adenocarcinoma and its correlation with lymph node metastasis,” *Int. J. Colorectal Dis.*, vol. 22, no. 10, pp. 1179–1184, 2007.
- [298] B. Stephens, H. Han, G. Hostetter, M. J. Demeure, and D. D. Von Hoff, “Small interfering RNA-mediated knockdown of PRL phosphatases results in altered Akt phosphorylation and reduced clonogenicity of pancreatic cancer cells,” *Mol. Cancer Ther.*, vol. 7, no. 1, pp. 202–210, 2008.
- [299] Y. Luo, F. Liang, and Z.-Y. Zhang, “PRL1 Promotes Cell Migration and Invasion by Increasing MMP2 and MMP9 Expression through Src and ERK1/2 Pathways[†],” *Biochemistry*, vol. 48, no. 8, pp. 1838–1846, 2009.
- [300] E. Kostantin, S. Hardy, W. C. Valinsky, A. Kompatscher, J. H. F. de Baaij, Y. Zolotarov, M. Landry, N. Uetani, L. A. Martínez-Cruz, J. G. J. Hoenderop, A. Shrier, and M. L. Tremblay, “Inhibition of PRL-2-CNNM3 Protein Complex Formation Decreases Breast Cancer Proliferation and Tumor Growth.,” *J. Biol. Chem.*, vol. 291, no. 20, pp. 10716–25, 2016.
- [301] S. Saha, “A Phosphatase Associated with Metastasis of Colorectal Cancer,” *Science (80-.)*, vol. 294, no. 5545, pp. 1343–1346, 2001.
- [302] T. E. Buffart, J. Coffa, M. A. J. A. Hermsen, B. Carvalho, J. R. M. van der Sijp, B. Ylstra, G. Pals, J. P. Schouten, and G. A. Meijer, “DNA copy number changes at 8q11-24 in metastasized colorectal cancer.,” *Cell. Oncol.*, vol. 27, no. 1, pp. 57–65, 2005.
- [303] A. Bardelli, S. Saha, J. A. Sager, K. E. Romans, B. Xin, S. D. Markowitz, C. Lengauer, V. E. Velculescu, K. W. Kinzler, and B. Vogelstein, “PRL-3 expression in metastatic cancers.,” *Clin. Cancer Res.*, vol.

- 9, no. 15, pp. 5607–15, 2003.
- [304] G. Zhao, Z. Zhou, W. Lei, C. Wang, X. Zheng, and Y. Zheng, “[Expression of phosphatase of regeneration liver-3 in human colorectal carcinoma and its prognosis value].,” *Zhonghua Wei Chang Wai Ke Za Zhi*, vol. 11, no. 5, pp. 487–91, 2008.
- [305] K. Hatate, K. Yamashita, K. Hirai, H. Kumamoto, T. Sato, H. Ozawa, T. Nakamura, W. Onozato, Y. Kokuba, A. Ihara, and M. Watanabe, “Liver metastasis of colorectal cancer by protein-tyrosine phosphatase type 4A, 3 (PRL-3) is mediated through lymph node metastasis and elevated serum tumor markers such as CEA and CA19-9.,” *Oncol. Rep.*, vol. 20, no. 4, pp. 737–43, 2008.
- [306] K. Guzinska-Ustymowicz, A. Pryczynicz, and A. Kemonia, “PTP4A3 expression increases strongly in lymph node metastases from colorectal carcinoma.,” *Anticancer Res.*, vol. 29, no. 10, pp. 3913–6, 2009.
- [307] U. A. Miskad, S. Semba, H. Kato, and H. Yokozaki, “Expression of PRL-3 Phosphatase in Human Gastric Carcinomas: Close Correlation with Invasion and Metastasis,” *Pathobiology*, vol. 71, no. 4, pp. 176–184, 2004.
- [308] Z.-R. Li, Z. Wang, B.-H. Zhu, Y.-L. He, J.-S. Peng, S.-R. Cai, J.-P. Ma, and W.-H. Zhan, “Association of Tyrosine PRL-3 Phosphatase Protein Expression with Peritoneal Metastasis of Gastric Carcinoma and Prognosis,” *Surg. Today*, vol. 37, no. 8, pp. 646–651, 2007.
- [309] I. Radke, M. Götte, C. Kersting, B. Mattsson, L. Kiesel, and P. Wülfing, “Expression and prognostic impact of the protein tyrosine phosphatases PRL-1, PRL-2 and PRL-3 in breast cancer,” *Br. J. Cancer*, vol. 95, no. 3, pp. 347–354, 2006.
- [310] R.-T. Hao, X.-H. Zhang, Y.-F. Pan, H.-G. Liu, Y.-Q. Xiang, L. Wan, and X.-L. Wu, “Prognostic and metastatic value of phosphatase of regenerating liver-3 in invasive breast cancer,” *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, vol. 136, no. 9, pp. 1349–1357, 2010.
- [311] F. Polato, A. Codegoni, R. Fruscio, P. Perego, C. Mangioni, S. Saha, A. Bardelli, and M. Broggin, “PRL-3 phosphatase is implicated in ovarian cancer growth.,” *Clin. Cancer Res.*, vol. 11, no. 19 Pt 1, pp. 6835–9, 2005.
- [312] T. Ren, B. Jiang, X. Xing, B. Dong, L. Peng, L. Meng, H. Xu, and C. Shou, “Prognostic Significance of Phosphatase of Regenerating Liver-3 Expression in Ovarian Cancer,” *Pathol. Oncol. Res.*, vol. 15, no. 4, pp. 555–560, 2009.
- [313] Y.-Q. Liu, H.-X. Li, X. Lou, and J.-Y. Lei, “Expression of phosphatase of regenerating liver 1 and 3 mRNA in esophageal squamous cell carcinoma.,” *Arch. Pathol. Lab. Med.*, vol. 132, no. 8, pp. 1307–12, 2008.
- [314] A. Ooki, K. Yamashita, S. Kikuchi, S. Sakuramoto, N. Katada, and M. Watanabe, “Phosphatase of regenerating liver-3 as a convergent therapeutic target for lymph node metastasis in esophageal squamous cell carcinoma,” *Int. J. Cancer*, vol. 127, no. 3, pp. 543–554, 2010.
- [315] Y. Ma and B. Li, “Expression of phosphatase of regenerating liver-3 in squamous cell carcinoma of the cervix,” *Med. Oncol.*, vol. 28, no. 3, pp. 775–780, 2011.
- [316] J. Zhou, S. Wang, J. Lu, J. Li, and Y. Ding, “Over-expression of phosphatase of regenerating liver-3

Bibliographie

- correlates with tumor progression and poor prognosis in nasopharyngeal carcinoma," *Int. J. Cancer*, vol. 124, no. 8, pp. 1879–1886, 2009.
- [317] Y. Xu, M. Zhu, S. Zhang, H. Liu, T. Li, and C. Qin, "Expression and Prognostic Value of PRL-3 in Human Intrahepatic Cholangiocarcinoma," *Pathol. Oncol. Res.*, vol. 16, no. 2, pp. 169–175, 2010.
- [318] W.-B. Zhao, Y. Li, X. Liu, L.-Y. Zhang, and X. Wang, "Evaluation of PRL-3 expression, and its correlation with angiogenesis and invasion in hepatocellular carcinoma," *Int. J. Mol. Med.*, vol. 22, no. 2, pp. 187–92, 2008.
- [319] J. Ming, N. Liu, Y. Gu, X. Qiu, and E.-H. Wang, "PRL-3 facilitates angiogenesis and metastasis by increasing ERK phosphorylation and up-regulating the levels and activities of Rho-A/C in lung cancer.," *Pathology*, vol. 41, no. 2, pp. 118–26, 2009.
- [320] L. Kong, Q. Li, L. Wang, Z. Liu, and T. Sun, "The value and correlation between PRL-3 expression and matrix metalloproteinase activity and expression in human gliomas," *Neuropathology*, vol. 27, no. 6, pp. 516–521, 2007.
- [321] Q. Dong, X. Ding, B. Chang, H. Wang, and A. Wang, "PRL-3 promotes migration and invasion and is associated with poor prognosis in salivary adenoid cystic carcinoma.," *J. Oral Pathol. Med.*, vol. 45, no. 2, pp. 111–8, 2016.
- [322] C. Laurent, F. Valet, N. Planque, L. Silveri, S. Maacha, O. Anezo, P. Hupe, C. Plancher, C. Reyes, B. Albaud, A. Rapinat, D. Gentien, J. Couturier, X. Sastre-Garau, L. Desjardins, J.-P. Thiery, S. Roman-Roman, B. Asselain, E. Barillot, S. Piperno-Neumann, and S. Saule, "High PTP4A3 phosphatase expression correlates with metastatic risk in uveal melanoma patients.," *Cancer Res.*, vol. 71, no. 3, pp. 666–74, 2011.
- [323] S. Qu, B. Liu, X. Guo, H. Shi, M. Zhou, L. Li, S. Yang, X. Tong, and H. Wang, "Independent oncogenic and therapeutic significance of phosphatase PRL-3 in FLT3-ITD-negative acute myeloid leukemia," *Cancer*, vol. 120, no. 14, pp. 2130–2141, 2014.
- [324] A. Broyl, D. Hose, H. Lokhorst, Y. de Knecht, J. Peeters, A. Jauch, U. Bertsch, A. Buijs, M. Stevens-Kroef, H. B. Beverloo, E. Vellenga, S. Zweegman, M.-J. Kersten, B. van der Holt, L. el Jarari, G. Mulligan, H. Goldschmidt, M. van Duin, and P. Sonneveld, "Gene expression profiling for molecular classification of multiple myeloma in newly diagnosed patients," *Blood*, vol. 116, no. 14, pp. 2543–2553, 2010.
- [325] H. Wang, S. Y. Quah, J. M. Dong, E. Manser, J. P. Tang, and Q. Zeng, "PRL-3 down-regulates PTEN expression and signals through PI3K to promote epithelial-mesenchymal transition.," *Cancer Res.*, vol. 67, no. 7, pp. 2922–6, 2007.
- [326] J. Zhou, S. H.-M. Toh, Z.-L. Chan, J. Y. Quah, J.-Y. Chooi, T. Z. Tan, P. S. Y. Chong, Q. Zeng, and W.-J. Chng, "A loss-of-function genetic screening reveals synergistic targeting of AKT/mTOR and WTN/ β -catenin pathways for treatment of AML with high PRL-3 phosphatase.," *J. Hematol. Oncol.*, vol. 11, no. 1, p. 36, 2018.
- [327] Z. Ye, A. Q. O. Al-Aidaros, J. E. Park, H. F. Yuen, S. D. Zhang, A. Gupta, Y. Lin, H.-M. Shen, and Q. Zeng, "PRL-3 activates mTORC1 in Cancer Progression.," *Sci. Rep.*, vol. 5, p. 17046, 2015.
- [328] A. Q. O. Al-Aidaros, H. F. Yuen, K. Guo, S. D. Zhang, T.-H. Chung, W. J. Chng, and Q. Zeng,

- “Metastasis-associated PRL-3 induces EGFR activation and addiction in cancer cells.,” *J. Clin. Invest.*, vol. 123, no. 8, pp. 3459–71, 2013.
- [329] J. Ming, Y. Jiang, G. Jiang, and H. Zheng, “Phosphatase of regenerating liver-3 induces angiogenesis by increasing extracellular signal-regulated kinase phosphorylation in endometrial adenocarcinoma.,” *Pathobiology*, vol. 81, no. 1, pp. 1–7, 2014.
- [330] M. W. Zimmerman, K. E. McQueeney, J. S. Isenberg, B. R. Pitt, K. A. Wasserloos, G. E. Homanics, and J. S. Lazo, “Protein-tyrosine phosphatase 4A3 (PTP4A3) promotes vascular endothelial growth factor signaling and enables endothelial cell motility.,” *J. Biol. Chem.*, vol. 289, no. 9, pp. 5904–13, 2014.
- [331] S. Basak, S. B. R. Jacobs, A. J. Krieg, N. Pathak, Q. Zeng, P. Kaldis, A. J. Giaccia, and L. D. Attardi, “The metastasis-associated gene Prl-3 is a p53 target involved in cell-cycle regulation.,” *Mol. Cell*, vol. 30, no. 3, pp. 303–14, 2008.
- [332] H. Xie and H. Wang, “PRL-3 promotes breast cancer progression by downregulating p14ARF-mediated p53 expression,” *Oncol. Lett.*, vol. 15, no. 3, pp. 2795–2800, 2017.
- [333] S.-H. Min, D. M. Kim, Y.-S. Heo, H. M. Kim, I.-C. Kim, and O.-J. Yoo, “Downregulation of p53 by phosphatase of regenerating liver 3 is mediated by MDM2 and PIRH2.,” *Life Sci.*, vol. 86, no. 1–2, pp. 66–72, 2010.
- [334] F. Liang, J. Liang, W.-Q. Wang, J.-P. Sun, E. Udho, and Z.-Y. Zhang, “PRL3 promotes cell invasion and proliferation by down-regulation of Csk leading to Src activation.,” *J. Biol. Chem.*, vol. 282, no. 8, pp. 5413–9, 2007.
- [335] T. S. Slørdahl, P. Abdollahi, E. N. Vandsemb, C. Rampa, K. Misund, K. A. Baranowska, M. Westrin, A. Waage, T. B. Rø, and M. Børset, “The phosphatase of regenerating liver-3 (PRL-3) is important for IL-6-mediated survival of myeloma cells.,” *Oncotarget*, vol. 7, no. 19, pp. 27295–306, 2016.
- [336] P. Zhang, Z. Zhang, X. Li, J. Lei, K. Su, X. Li, and X. Wang, “[Expression and its relationship of PRL-3 and RhoC in non-small cell lung cancer].,” *Zhongguo Fei Ai Za Zhi*, vol. 13, no. 6, pp. 598–601, 2010.
- [337] P. ZHANG, P. ZHANG, Z. ZHANG, X. LI, J. LEI, K. SU, X. LI, and X. WANG, “Expression and its Relationship of PRL-3 and RhoC in Non-small Cell Lung Cancer,” *Chinese J. Lung Cancer*, vol. 13, no. 6, pp. 598–601, 2010.
- [338] E. Forte, L. Orsatti, F. Talamo, G. Barbato, R. De Francesco, and L. Tomei, “Ezrin is a specific and direct target of protein tyrosine phosphatase PRL-3.,” *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1783, no. 2, pp. 334–44, 2008.
- [339] S. Lian, L. Meng, X. Xing, Y. Yang, L. Qu, and C. Shou, “PRL-3 promotes cell adhesion by interacting with JAM2 in colon cancer.,” *Oncol. Lett.*, vol. 12, no. 3, pp. 1661–1666, 2016.
- [340] L. Peng, G. Jin, L. Wang, J. Guo, L. Meng, and C. Shou, “Identification of integrin alpha1 as an interacting protein of protein tyrosine phosphatase PRL-3.,” *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 342, no. 1, pp. 179–83, 2006.
- [341] W. Tian, L. Qu, L. Meng, C. Liu, J. Wu, and C. Shou, “Phosphatase of regenerating liver-3 directly

- interacts with integrin $\beta 1$ and regulates its phosphorylation at tyrosine 783.," *BMC Biochem.*, vol. 13, p. 22, 2012.
- [342] P. Zheng, Y.-X. Liu, L. Chen, X.-H. Liu, Z.-Q. Xiao, L. Zhao, G.-Q. Li, J. Zhou, Y.-Q. Ding, and J.-M. Li, "Stathmin, a new target of PRL-3 identified by proteomic methods, plays a key role in progression and metastasis of colorectal cancer.," *J. Proteome Res.*, vol. 9, no. 10, pp. 4897–905, 2010.
- [343] E. Mizuuchi, S. Semba, Y. Kodama, and H. Yokozaki, "Down-modulation of keratin 8 phosphorylation levels by PRL-3 contributes to colorectal carcinoma progression.," *Int. J. Cancer*, vol. 124, no. 8, pp. 1802–10, 2009.
- [344] D. Krndija, C. Münzberg, U. Maass, M. Hafner, G. Adler, H. A. Kestler, T. Seufferlein, F. Oswald, and G. von Wichert, "The phosphatase of regenerating liver 3 (PRL-3) promotes cell migration through Arf-activity-dependent stimulation of integrin $\alpha 5$ recycling.," *J. Cell Sci.*, vol. 125, no. Pt 16, pp. 3883–92, 2012.
- [345] S. Lian, L. Meng, C. Liu, X. Xing, Q. Song, B. Dong, Y. Han, Y. Yang, L. Peng, L. Qu, and C. Shou, "PRL-3 activates NF- κ B signaling pathway by interacting with RAP1.," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 430, no. 1, pp. 196–201, 2013.
- [346] V. McParland, G. Varsano, X. Li, J. Thornton, J. Baby, A. Aravind, C. Meyer, K. Pavic, P. Rios, and M. Köhn, "The metastasis-promoting phosphatase PRL-3 shows activity toward phosphoinositides.," *Biochemistry*, vol. 50, no. 35, pp. 7579–90, 2011.
- [347] P. den Hollander, K. Rawls, A. Tsimelzon, J. Shepherd, A. Mazumdar, J. Hill, S. A. W. Fuqua, J. C. Chang, C. K. Osborne, S. G. Hilsenbeck, G. B. Mills, and P. H. Brown, "Phosphatase PTP4A3 Promotes Triple-Negative Breast Cancer Growth and Predicts Poor Patient Survival," *Cancer Res.*, vol. 76, no. 7, pp. 1942–1953, 2016.
- [348] J. Zhou, P. S. Y. Chong, X. Lu, L.-L. Cheong, C. Bi, S.-C. Liu, Y. Zhou, T. Z. Tan, H. Yang, T.-H. Chung, Q. Zeng, and W.-J. Chng, "Phosphatase of regenerating liver-3 is regulated by signal transducer and activator of transcription 3 in acute myeloid leukemia.," *Exp. Hematol.*, vol. 42, no. 12, pp. 1041-52.e1–2, 2014.
- [349] T. Rubio and M. Köhn, "Regulatory mechanisms of phosphatase of regenerating liver (PRL)-3," *Biochem. Soc. Trans.*, vol. 44, no. 5, pp. 1305–1312, 2016.
- [350] C. Haferlach, F. Dicker, H. Herholz, S. Schnittger, W. Kern, and T. Haferlach, "Mutations of the TP53 gene in acute myeloid leukemia are strongly associated with a complex aberrant karyotype," *Leukemia*, vol. 22, no. 8, pp. 1539–1541, 2008.
- [351] P. Zheng, H.-M. Meng, W.-Z. Gao, L. Chen, X.-H. Liu, Z.-Q. Xiao, Y.-X. Liu, H.-M. Sui, J. Zhou, Y.-H. Liu, and J.-M. Li, "Snail as a key regulator of PRL-3 gene in colorectal cancer.," *Cancer Biol. Ther.*, vol. 12, no. 8, pp. 742–9, 2011.
- [352] J. Xu, S. Cao, L. Wang, R. Xu, G. Chen, and Q. Xu, "VEGF promotes the transcription of the human PRL-3 gene in HUVEC through transcription factor MEF2C.," *PLoS One*, vol. 6, no. 11, p. e27165, 2011.
- [353] Y. Jiang, X.-Q. Liu, A. Rajput, L. Geng, M. Ongchin, Q. Zeng, G. S. Taylor, and J. Wang, "Phosphatase PRL-3 is a direct regulatory target of TGFbeta in colon cancer metastasis.," *Cancer Res.*, vol. 71,

- no. 1, pp. 234–44, 2011.
- [354] Z. Li, G. Zhang, D. Li, Z. Jie, H. Chen, J. Xiong, Y. Liu, Y. Cao, M. Jiang, Z. Le, and S. Tan, “Methylation-associated silencing of miR-495 inhibit the migration and invasion of human gastric cancer cells by directly targeting PRL-3,” *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 456, no. 1, pp. 344–50, 2015.
- [355] Z. Li, Y. Cao, Z. Jie, Y. Liu, Y. Li, J. Li, G. Zhu, Z. Liu, Y. Tu, G. Peng, D. Lee, and S. Park, “miR-495 and miR-551a inhibit the migration and invasion of human gastric cancer cells by directly interacting with PRL-3,” *Cancer Lett.*, vol. 323, no. 1, pp. 41–7, 2012.
- [356] L. Wang, J. Liu, Z. Zhong, X. Gong, W. Liu, L. Shi, and X. Li, “PTP4A3 is a target for inhibition of cell proliferation, migration and invasion through Akt/mTOR signaling pathway in glioblastoma under the regulation of miR-137,” *Brain Res.*, vol. 1646, pp. 441–50, 2016.
- [357] H. Wang, L. A. Vardy, C. P. Tan, J. M. Loo, K. Guo, J. Li, S. G. Lim, J. Zhou, W. J. Chng, S. B. Ng, H. X. Li, and Q. Zeng, “PCBP1 suppresses the translation of metastasis-associated PRL-3 phosphatase,” *Cancer Cell*, vol. 18, no. 1, pp. 52–62, 2010.
- [358] G. H. Peters, T. M. Frimurer, and O. H. Olsen, “Electrostatic Evaluation of the Signature Motif (H/V)CX₅R(S/T) in Protein–Tyrosine Phosphatases[†],” *Biochemistry*, vol. 37, no. 16, pp. 5383–5393, 1998.
- [359] T. Ishii, Y. Funato, and H. Miki, “Thioredoxin-related Protein 32 (TRP32) Specifically Reduces Oxidized Phosphatase of Regenerating Liver (PRL),” *J. Biol. Chem.*, vol. 288, no. 10, pp. 7263–7270, 2013.
- [360] R. A. Klinghoffer, C. Sachsenmaier, J. A. Cooper, and P. Soriano, “Src family kinases are required for integrin but not PDGFR signal transduction,” *EMBO J.*, vol. 18, no. 9, pp. 2459–71, 1999.
- [361] J. J. Fiordalisi, B. J. Dewar, L. M. Graves, J. P. Madigan, and A. D. Cox, “Src-mediated phosphorylation of the tyrosine phosphatase PRL-3 is required for PRL-3 promotion of Rho activation, motility and invasion,” *PLoS One*, vol. 8, no. 5, p. e64309, 2013.
- [362] P. Adamson, C. J. Marshall, A. Hall, and P. A. Tilbrook, “Post-translational modifications of p21rho proteins,” *J. Biol. Chem.*, vol. 267, no. 28, pp. 20033–8, 1992.
- [363] A. Nishimura and M. E. Linder, “Identification of a Novel Prenyl and Palmitoyl Modification at the CaaX Motif of Cdc42 That Regulates RhoGDI Binding,” *Mol. Cell. Biol.*, vol. 33, no. 7, pp. 1417–1429, 2013.
- [364] J. Greaves and L. H. Chamberlain, “DHHC palmitoyl transferases: substrate interactions and (patho)physiology,” *Trends Biochem. Sci.*, vol. 36, no. 5, pp. 245–253, 2011.
- [365] M.-S. Choi, S.-H. Min, H. Jung, J. D. Lee, T. H. Lee, H. K. Lee, and O.-J. Yoo, “The essential role of FKBP38 in regulating phosphatase of regenerating liver 3 (PRL-3) protein stability,” *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 406, no. 2, pp. 305–9, 2011.
- [366] Y.-H. Huang, A. Q. O. Al-Aidaros, H.-F. Yuen, S.-D. Zhang, H.-M. Shen, E. Rozycka, C. M. McCrudden, V. Tergaonkar, A. Gupta, Y. Bin Lin, J. P. Thiery, J. T. Murray, and Q. Zeng, “A role of autophagy in PTP4A3-driven cancer progression,” *Autophagy*, vol. 10, no. 10, pp. 1–14, 2014.

Bibliographie

- [367] C. Xing, X.-X. Lu, P.-D. Guo, T. Shen, S. Zhang, X.-S. He, W.-J. Gan, X.-M. Li, J.-R. Wang, Y.-Y. Zhao, H. Wu, and J.-M. Li, "Ubiquitin-Specific Protease 4-Mediated Deubiquitination and Stabilization of PRL-3 Is Required for Potentiating Colorectal Oncogenesis," *Cancer Res.*, vol. 76, no. 1, pp. 83–95, 2016.
- [368] M. K. Moon, Y.-M. Han, Y.-J. Lee, L. H. Lee, J. H. Yang, B.-M. Kwon, and D. K. Kim, "Inhibitory activities of anthraquinones from *Rubia akane* on phosphatase regenerating liver-3," *Arch. Pharm. Res.*, vol. 33, no. 11, pp. 1747–1751, 2010.
- [369] H. Park, S.-K. Jung, D. G. Jeong, S. E. Ryu, and S. J. Kim, "Discovery of novel PRL-3 inhibitors based on the structure-based virtual screening," *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, vol. 18, no. 7, pp. 2250–2255, 2008.
- [370] S. Daouti, W. -h. Li, H. Qian, K.-S. Huang, J. Holmgren, W. Levin, L. Reik, D. L. McGady, P. Gillespie, A. Perrotta, H. Bian, J. F. Reidhaar-Olson, S. A. Bliss, A. R. Olivier, J. A. Sergi, D. Fry, W. Danho, S. Ritland, N. Fotouhi, D. Heimbrook, and H. Niu, "A Selective Phosphatase of Regenerating Liver Phosphatase Inhibitor Suppresses Tumor Cell Anchorage-Independent Growth by a Novel Mechanism Involving p130Cas Cleavage," *Cancer Res.*, vol. 68, no. 4, pp. 1162–1169, 2008.
- [371] M. K. Pathak, D. Dhawan, D. J. Lindner, E. C. Borden, C. Farver, and T. Yi, "Pentamidine is an inhibitor of PRL phosphatases with anticancer activity.," *Mol. Cancer Ther.*, vol. 1, no. 14, pp. 1255–64, 2002.
- [372] L. F. Zerbin, M. K. Bhasin, J. F. de Vasconcellos, J. D. Paccetz, X. Gu, A. L. Kung, and T. A. Libermann, "Computational Repositioning and Preclinical Validation of Pentamidine for Renal Cell Cancer," *Mol. Cancer Ther.*, vol. 13, no. 7, pp. 1929–1941, 2014.
- [373] J. Smith, B. J. Stewart, S. Glaysher, K. Peregrin, L. A. Knight, D. J. Weber, and I. A. Cree, "The effect of pentamidine on melanoma ex vivo.," *Anticancer. Drugs*, vol. 21, no. 2, pp. 181–5, 2010.
- [374] E. Capoccia, C. Cirillo, A. Marchetto, S. Tiberi, Y. Sawikr, M. Pesce, A. D'Alessandro, C. Scuderi, G. Sarnelli, R. Cuomo, L. Steardo, and G. Esposito, "S100B-p53 disengagement by pentamidine promotes apoptosis and inhibits cellular migration via aquaporin-4 and metalloproteinase-2 inhibition in C6 glioma cells," *Oncol. Lett.*, vol. 9, no. 6, pp. 2864–2870, 2015.
- [375] C. Cirillo, E. Capoccia, T. Iuvone, R. Cuomo, G. Sarnelli, L. Steardo, and G. Esposito, "S100B Inhibitor Pentamidine Attenuates Reactive Gliosis and Reduces Neuronal Loss in a Mouse Model of Alzheimer's Disease," *Biomed Res. Int.*, vol. 2015, pp. 1–11, 2015.
- [376] J. Kobayashi, A. Kato, Y. Ota, R. Ohba, and K. Komatsu, "Bisbenzamidine derivative, pentamidine represses DNA damage response through inhibition of histone H2A acetylation," *Mol. Cancer*, vol. 9, no. 1, p. 34, 2010.
- [377] G. Min, S.-K. Lee, H.-N. Kim, Y.-M. Han, R.-H. Lee, D. G. Jeong, D. C. Han, and B.-M. Kwon, "Rhodanine-based PRL-3 inhibitors blocked the migration and invasion of metastatic cancer cells," *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, vol. 23, no. 13, pp. 3769–3774, 2013.
- [378] Y.-M. Han, S.-K. Lee, D. G. Jeong, S. E. Ryu, D. C. Han, D. K. Kim, and B.-M. Kwon, "Emodin inhibits migration and invasion of DLD-1 (PRL-3) cells via inhibition of PRL-3 phosphatase activity.," *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, vol. 22, no. 1, pp. 323–6, 2012.

- [379] J. H. Ahn, S. J. Kim, W. S. Park, S. Y. Cho, J. Du Ha, S. S. Kim, S. K. Kang, D. G. Jeong, S.-K. Jung, S.-H. Lee, H. M. Kim, S. K. Park, K. H. Lee, C. W. Lee, S. E. Ryu, and J.-K. Choi, "Synthesis and biological evaluation of rhodanine derivatives as PRL-3 inhibitors," *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, vol. 16, no. 11, pp. 2996–2999, 2006.
- [380] L. Wang, Y. Shen, R. Song, Y. Sun, J. Xu, and Q. Xu, "An Anticancer Effect of Curcumin Mediated by Down-Regulating Phosphatase of Regenerating Liver-3 Expression on Highly Metastatic Melanoma Cells," *Mol. Pharmacol.*, vol. 76, no. 6, pp. 1238–1245, Dec. 2009.
- [381] S.-K. Choi, H.-M. Oh, S.-K. Lee, D. G. Jeong, S. E. Ryu, K.-H. Son, D. C. Han, N.-D. Sung, N.-I. Baek, and B.-M. Kwon, "Biflavonoids inhibited phosphatase of regenerating liver-3 (PRL-3).," *Nat. Prod. Res.*, vol. 20, no. 4, pp. 341–6, Apr. 2006.
- [382] S. Stadlbauer, P. Rios, K. Ohmori, K. Suzuki, and M. Köhn, "Procyanidins Negatively Affect the Activity of the Phosphatases of Regenerating Liver," *PLoS One*, vol. 10, no. 7, p. e0134336, 2015.
- [383] K. Guo, J. P. Tang, C. P. B. Tan, H. Wang, and Q. Zeng, "Monoclonal antibodies target intracellular PRL phosphatases to inhibit cancer metastases in mice.," *Cancer Biol. Ther.*, vol. 7, no. 5, pp. 750–7, 2008.
- [384] M. Thura, A. Q. O. Al-Aidaros, W. P. Yong, K. Kono, A. Gupta, Y. Bin Lin, K. Mimura, J. P. Thiery, B. C. Goh, P. Tan, R. Soo, C. W. Hong, L. Wang, S. J. Lin, E. Chen, S. Y. Rha, H. C. Chung, J. Li, S. Nandi, H. F. Yuen, S.-D. Zhang, Y. K. Guan, J. So, and Q. Zeng, "PRL3-zumab, a first-in-class humanized antibody for cancer therapy," *JCI Insight*, vol. 1, no. 9, p. e87607, 2016.
- [385] P. A. Konstantinopoulos, M. V. Karamouzis, and A. G. Papavassiliou, "Post-translational modifications and regulation of the RAS superfamily of GTPases as anticancer targets," *Nat. Rev. Drug Discov.*, vol. 6, no. 7, pp. 541–555, 2007.
- [386] E. C. Lerner, Y. Qian, M. A. Blaskovich, R. D. Fossum, A. Vogt, J. Sun, A. D. Cox, C. J. Der, A. D. Hamilton, and S. M. Sebti, "Ras CAAX peptidomimetic FTI-277 selectively blocks oncogenic Ras signaling by inducing cytoplasmic accumulation of inactive Ras-Raf complexes.," *J. Biol. Chem.*, vol. 270, no. 45, pp. 26802–6, 1995.
- [387] T. F. Gajewski, A. K. Salama, D. Niedzwiecki, J. Johnson, G. Linette, C. Bucher, M. A. Blaskovich, S. M. Sebti, F. Haluska, and Cancer and Leukemia Group B, "Phase II study of the farnesyltransferase inhibitor R115777 in advanced melanoma (CALGB 500104)," *J. Transl. Med.*, vol. 10, no. 1, p. 246, 2012.
- [388] Y. Goshima, F. Nakamura, P. Strittmatter, and S. M. Strittmatter, "Collapsin-induced growth cone collapse mediated by an intracellular protein related to UNC-33," *Nature*, vol. 376, no. 6540, pp. 509–514, Aug. 1995.
- [389] J. E. Minturn, H. J. Fryer, D. H. Geschwind, and S. Hockfield, "TOAD-64, a gene expressed early in neuronal differentiation in the rat, is related to unc-33, a C. elegans gene involved in axon outgrowth.," *J. Neurosci.*, vol. 15, no. 10, pp. 6757–66, 1995.
- [390] N. Hamajima, K. Matsuda, S. Sakata, N. Tamaki, M. Sasaki, and M. Nonaka, "A novel gene family defined by human dihydropyrimidinase and three related proteins with differential tissue distribution.," *Gene*, vol. 180, no. 1–2, pp. 157–63, 1996.

Bibliographie

- [391] T. T. Quach, B. Mosinger, D. Ricard, N. G. Copeland, D. J. Gilbert, N. A. Jenkins, B. Stankoff, J. Honnorat, M. F. Belin, and P. Kolattukudy, "Collapsin response mediator protein-3/unc-33-like protein-4 gene: organization, chromosomal mapping and expression in the developing mouse brain.," *Gene*, vol. 242, no. 1–2, pp. 175–82, 2000.
- [392] D. Ricard, V. Rogemond, E. Charrier, M. Aguera, D. Bagnard, M. F. Belin, N. Thomasset, and J. Honnorat, "Isolation and expression pattern of human Unc-33-like phosphoprotein 6/collapsin response mediator protein 5 (Ulip6/CRMP5): coexistence with Ulip2/CRMP2 in Sema3a- sensitive oligodendrocytes.," *J. Neurosci.*, vol. 21, no. 18, pp. 7203–14, 2001.
- [393] T. Byk, T. Dobransky, C. Cifuentes-Diaz, and a Sobel, "Identification and molecular characterization of Unc-33-like phosphoprotein (Ulip), a putative mammalian homolog of the axonal guidance-associated unc-33 gene product.," *J. Neurosci.*, vol. 16, no. 2, pp. 688–701, 1996.
- [394] F. Coulier, C. Popovici, R. Villet, and D. Birnbaum, "MetaHoxgene clusters," *J. Exp. Zool.*, vol. 288, no. 4, pp. 345–351, 2000.
- [395] M. Fukada, I. Watakabe, J. Yuasa-Kawada, H. Kawachi, A. Kuroiwa, Y. Matsuda, and M. Noda, "Molecular Characterization of CRMP5, a Novel Member of the Collapsin Response Mediator Protein Family," *J. Biol. Chem.*, vol. 275, no. 48, pp. 37957–37965, 2000.
- [396] R. C. Deo, E. F. Schmidt, A. Elhabazi, H. Togashi, S. K. Burley, and S. M. Strittmatter, "Structural bases for CRMP function in plexin-dependent semaphorin3A signaling.," *EMBO J.*, vol. 23, no. 1, pp. 9–22, 2004.
- [397] L. Wang and S. M. Strittmatter, "Brain CRMP Forms Heterotetramers Similar to Liver Dihydropyrimidinase," *J Neurochem.*, vol. 69, no. 6, pp. 2261-9, 1997.
- [398] R. Ponnusamy and B. Lohkamp, "Insights into the oligomerization of CRMPs: Crystal structure of human collapsin response mediator protein 5," *J. Neurochem.*, vol. 125, no. 6, pp. 855–868, 2013.
- [399] P. Stenmark, D. Ogg, S. Flodin, A. Flores, T. Kotenyova, T. Nyman, P. Nordlund, and P. Kursula, "The structure of human collapsin response mediator protein 2, a regulator of axonal growth," *J. Neurochem.*, vol. 101, no. 4, pp. 906–917, 2007.
- [400] S. Petratos and J. Y. Lee, "Stop CRMPing my style: A new competitive model of CRMP oligomerization," *J. Neurochem.*, vol. 125, no. 6, pp. 800–802, 2013.
- [401] S.-H. Liu, S.-F. Huang, Y.-L. Hsu, S.-H. Pan, Y.-J. Chen, and Y.-H. Lin, "Structure of human collapsin response mediator protein 1: a possible role of its C-terminal tail," *Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Commun.*, vol. 71, no. 8, pp. 938–945, 2015.
- [402] Z. He, K. C. Wang, V. Koprivica, G. Ming, and H.-J. Song, "Knowing How to Navigate: Mechanisms of Semaphorin Signaling in the Nervous System," *Sci. Signal.*, vol. 2002, no. 119, pp. re1-re1, 2002.
- [403] T. Skutella and R. Nitsch, "New molecules for hippocampal development.," *Trends Neurosci.*, vol. 24, no. 2, pp. 107–13, 2001.
- [404] I. Gavazzi, "Semaphorin-neuropilin-1 interactions in plasticity and regeneration of adult neurons," *Cell Tissue Res.*, vol. 305, no. 2, pp. 275–284, 2001.
- [405] Z. He and M. Tessier-Lavigne, "Neuropilin is a receptor for the axonal chemorepellent Semaphorin

- III.," *Cell*, vol. 90, no. 4, pp. 739–51, 1997.
- [406] A. L. Kolodkin and D. D. Ginty, "Steering clear of semaphorins: neuropilins sound the retreat.," *Neuron*, vol. 19, no. 6, pp. 1159–62, 1997.
- [407] E. F. Schmidt and S. M. Strittmatter, "The CRMP family of proteins and their role in Sema3A signaling.," *Adv. Exp. Med. Biol.*, vol. 600, pp. 1–11, 2007.
- [408] P.-C. Lin, P. M. Chan, C. Hall, and E. Manser, "Collapsin response mediator proteins (CRMPs) are a new class of microtubule-associated protein (MAP) that selectively interacts with assembled microtubules via a taxol-sensitive binding interaction.," *J. Biol. Chem.*, vol. 286, no. 48, pp. 41466–78, 2011.
- [409] Y. Gu, N. Hamajima, and Y. Ihara, "Neurofibrillary tangle-associated collapsin response mediator protein-2 (CRMP-2) is highly phosphorylated on Thr-509, Ser-518, and Ser-522.," *Biochemistry*, vol. 39, no. 15, pp. 4267–75, 2000.
- [410] Y. Fukata, T. J. Itoh, T. Kimura, C. Ménager, T. Nishimura, T. Shiromizu, H. Watanabe, N. Inagaki, A. Iwamatsu, H. Hotani, and K. Kaibuchi, "CRMP-2 binds to tubulin heterodimers to promote microtubule assembly," *Nat. Cell Biol.*, vol. 4, no. 8, pp. 583–591, 2002.
- [411] S. Niwa, F. Nakamura, Y. Tomabechi, M. Aoki, H. Shigematsu, T. Matsumoto, A. Yamagata, S. Fukai, N. Hirokawa, Y. Goshima, M. Shirouzu, and R. Nitta, "Structural basis for CRMP2-induced axonal microtubule formation.," *Sci. Rep.*, vol. 7, no. 1, p. 10681, 2017.
- [412] Z. Zhang, V. Majava, A. Greffier, R. L. Hayes, P. Kursula, and K. K. W. Wang, "Collapsin response mediator protein-2 is a calmodulin-binding protein.," *Cell. Mol. Life Sci.*, vol. 66, no. 3, pp. 526–36, 2009.
- [413] S. O. Tone, Y. Z. Alabed, and A. E. Fournier, "The role of CRMP4 in nerve regenerations," *Clin. Investig. Med.*, vol. 30, no. 4, p. 91, 2007.
- [414] V. Rosslenbroich, L. Dai, S. L. Baader, A. A. Noegel, V. Gieselmann, and J. Kappler, "Collapsin response mediator protein-4 regulates F-actin bundling," *Exp. Cell Res.*, vol. 310, no. 2, pp. 434–444, 2005.
- [415] M. Tan, C. Cha, Y. Ye, J. Zhang, S. Li, F. Wu, S. Gong, and G. Guo, "CRMP4 and CRMP2 Interact to Coordinate Cytoskeleton Dynamics, Regulating Growth Cone Development and Axon Elongation.," *Neural Plast.*, vol. 2015, p. 947423, 2015.
- [416] J. Yuasa-Kawada, R. Suzuki, F. Kano, T. Ohkawara, M. Murata, and M. Noda, "Axonal morphogenesis controlled by antagonistic roles of two CRMP subtypes in microtubule organization," *Eur. J. Neurosci.*, vol. 17, no. 11, pp. 2329–2343, 2003.
- [417] H.-C. Yu-Kemp and W. M. Brieher, "Collapsin Response Mediator Protein-1 Regulates Arp2/3-dependent Actin Assembly," *J. Biol. Chem.*, vol. 291, no. 2, pp. 658–664, 2016.
- [418] S.-H. Pan, Y.-C. Chao, P.-F. Hung, H.-Y. Chen, S.-C. Yang, Y.-L. Chang, C.-T. Wu, C.-C. Chang, W.-L. Wang, W.-K. Chan, Y.-Y. Wu, T.-F. Che, L.-K. Wang, C.-Y. Lin, Y.-C. Lee, M.-L. Kuo, C.-H. Lee, J. J. W. Chen, T.-M. Hong, and P.-C. Yang, "The ability of LCRMP-1 to promote cancer invasion by enhancing filopodia formation is antagonized by CRMP-1.," *J. Clin. Invest.*, vol. 121, no. 8, pp.

Bibliographie

- 3189–205, 2011.
- [419] W. L. Wang, T. M. Hong, Y. L. Chang, C. T. Wu, S. H. Pan, and P. C. Yang, “Phosphorylation of LCRMP-1 by GSK3 β promotes filopodia formation, migration and invasion abilities in lung cancer cells,” *PLoS One*, vol. 7, no. 2, pp. 1–10, 2012.
- [420] A. Hotta, R. Inatome, J. Yuasa-Kawada, Q. Qin, H. Yamamura, and S. Yanagi, “Critical role of collapsin response mediator protein-associated molecule CRAM for filopodia and growth cone development in neurons,” *Mol. Biol. Cell*, vol. 16, no. 1, pp. 32–9, 2005.
- [421] T. Kimura, H. Watanabe, A. Iwamatsu, and K. Kaibuchi, “Tubulin and CRMP-2 complex is transported via Kinesin-1,” *J. Neurochem.*, vol. 93, no. 6, pp. 1371–82, 2005.
- [422] T. Nishimura, Y. Fukata, K. Kato, T. Yamaguchi, Y. Matsuura, H. Kamiguchi, and K. Kaibuchi, “CRMP-2 regulates polarized Numb-mediated endocytosis for axon growth,” *Nat. Cell Biol.*, vol. 5, no. 9, pp. 819–26, 2003.
- [423] N. Arimura, A. Hattori, T. Kimura, S. Nakamura, Y. Funahashi, S. Hirotsune, K. Furuta, T. Urano, Y. Y. Toyoshima, and K. Kaibuchi, “CRMP-2 directly binds to cytoplasmic dynein and interferes with its activity,” *J. Neurochem.*, vol. 111, no. 2, pp. 380–90, 2009.
- [424] J. Rahajeng, S. S. P. Giridharan, N. Naslavsky, and S. Caplan, “Collapsin response mediator protein-2 (Crmp2) regulates trafficking by linking endocytic regulatory proteins to dynein motors,” *J. Biol. Chem.*, vol. 285, no. 42, pp. 31918–31922, 2010.
- [425] J. M. Brittain, A. D. Piekarz, Y. Wang, T. Kondo, T. R. Cummins, and R. Khanna, “An Atypical Role for Collapsin Response Mediator Protein 2 (CRMP-2) in Neurotransmitter Release via Interaction with Presynaptic Voltage-gated Calcium Channels,” *J. Biol. Chem.*, vol. 284, no. 45, pp. 31375–31390, 2009.
- [426] X. X. Chi, B. S. Schmutzler, J. M. Brittain, Y. Wang, C. M. Hingtgen, G. D. Nicol, and R. Khanna, “Regulation of N-type voltage-gated calcium channels (Cav2.2) and transmitter release by collapsin response mediator protein-2 (CRMP-2) in sensory neurons,” *J. Cell Sci.*, vol. 122, no. 23, pp. 4351–4362, 2009.
- [427] A. Moutal, L. Sun, X. Yang, W. Li, S. Cai, S. Luo, and R. Khanna, “CRMP2–Neurofibromin Interface Drives NF1-related Pain,” *Neuroscience*, vol. 381, pp. 79–90, 2018.
- [428] P. Vincent, Y. Collette, R. Marignier, C. Vuillat, V. Rogemond, N. Davoust, C. Malcus, S. Cavagna, A. Gessain, I. Machuca-Gayet, M.-F. Belin, T. Quach, and P. Giraudon, “A role for the neuronal protein collapsin response mediator protein 2 in T lymphocyte polarization and migration,” *J. Immunol.*, vol. 175, no. 11, pp. 7650–60, 2005.
- [429] M. Varrin-Doyer, P. Vincent, S. Cavagna, N. Auvergnon, N. Noraz, V. Rogemond, J. Honnorat, M. Moradi-Améli, and P. Giraudon, “Phosphorylation of collapsin response mediator protein 2 on Tyr-479 regulates CXCL12-induced T lymphocyte migration,” *J. Biol. Chem.*, vol. 284, no. 19, pp. 13265–76, 2009.
- [430] P. Giraudon, A. Nicolle, S. Cavagna, C. Benetollo, R. Marignier, and M. Varrin-Doyer, “Insight into the role of CRMP2 (collapsin response mediator protein 2) in T lymphocyte migration: the particular context of virus infection,” *Cell Adh. Migr.*, vol. 7, no. 1, pp. 38–43, 2013.

- [431] A. R. Sarhan, J. Szyroka, S. Begum, M. G. Tomlinson, N. A. Hotchin, J. K. Heath, and D. L. Cunningham, "Quantitative Phosphoproteomics Reveals a Role for Collapsin Response Mediator Protein 2 in PDGF-Induced Cell Migration," *Sci. Rep.*, no. October 2016, pp. 1–12, 2017.
- [432] A. Aylsworth, S. X. Jiang, A. Desbois, and S. T. Hou, "Characterization of the role of full-length CRMP3 and its calpain-cleaved product in inhibiting microtubule polymerization and neurite outgrowth," *Exp. Cell Res.*, vol. 315, no. 16, pp. 2856–2868, 2009.
- [433] S. T. Hou, S. X. Jiang, A. Aylsworth, M. Cooke, and L. Zhou, "Collapsin response mediator protein 3 deacetylates histone H4 to mediate nuclear condensation and neuronal death," *Sci. Rep.*, vol. 3, no. 1, p. 1350, 2013.
- [434] T. T. Quach, Y. Wang, R. Khanna, N. Chounlamountri, N. Auvergnon, J. Honnorat, and A.-M. Duchemin, "Effect of CRMP3 expression on dystrophic dendrites of hippocampal neurons," *Mol. Psychiatry*, vol. 16, no. 7, pp. 689–691, 2011.
- [435] T. T. Quach, G. Massicotte, M.-F. Belin, J. Honnorat, E. R. Glasper, A. C. Devries, L. B. Jakeman, M. Baudry, A.-M. Duchemin, and P. E. Kolattukudy, "CRMP3 is required for hippocampal CA1 dendritic organization and plasticity," *FASEB J.*, vol. 22, no. 2, pp. 401–409, 2008.
- [436] T. T. Quach, S. M. Wilson, V. Rogemond, N. Chounlamountri, P. E. Kolattukudy, S. Martinez, M. Khanna, M.-F. Belin, R. Khanna, J. Honnorat, and A.-M. Duchemin, "Mapping CRMP3 domains involved in dendrite morphogenesis and voltage-gated calcium channel regulation," *J. Cell Sci.*, vol. 126, no. 18, pp. 4262–4273, 2013.
- [437] Y. Chen, H. Sheng, Y. Xu, Y. Zhang, and X. Ni, "Activation of CRHR2 exerts an inhibitory effect on the expression of collapsin response mediator protein 3 in hippocampal neurons," *Neuropeptides*, vol. 46, no. 2, pp. 93–98, 2012.
- [438] S. Brot, V. Rogemond, V. Perrot, N. Chounlamountri, C. Auger, J. Honnorat, and M. Moradi-Améli, "CRMP5 interacts with tubulin to inhibit neurite outgrowth, thereby modulating the function of CRMP2.," *J. Neurosci.*, vol. 30, no. 32, pp. 10639–54, 2010.
- [439] A. Veyrac, S. Reibel, J. Sacquet, M. Mutin, J.-P. Camdessanche, P. Kolattukudy, J. Honnorat, and F. Jourdan, "CRMP5 Regulates Generation and Survival of Newborn Neurons in Olfactory and Hippocampal Neurogenic Areas of the Adult Mouse Brain," *PLoS One*, vol. 6, no. 10, p. e23721, 2011.
- [440] M. Morgan-Fisher, J. R. Couchman, and A. Yoneda, "Phosphorylation and mRNA splicing of collapsin response mediator protein-2 determine inhibition of rho-associated protein kinase (ROCK) II function in carcinoma cell migration and invasion.," *J. Biol. Chem.*, vol. 288, no. 43, pp. 31229–40, 2013.
- [441] A. Yoneda, M. Morgan-Fisher, R. Wait, J. R. Couchman, and U. M. Wewer, "A collapsin response mediator protein 2 isoform controls myosin II-mediated cell migration and matrix assembly by trapping ROCK II.," *Mol. Cell. Biol.*, vol. 32, no. 10, pp. 1788–804, 2012.
- [442] H. Guo and B. Xia, "Collapsin response mediator protein 4 isoforms (CRMP4a and CRMP4b) have opposite effects on cell proliferation, migration, and invasion in gastric cancer," *BMC Cancer*, vol. 16, no. 1, p. 565, 2016.

Bibliographie

- [443] V. Rogemond, C. Auger, P. Giraudon, M. Becchi, N. Auvergnon, M. F. Belin, J. Honnorat, and M. Moradi-Améli, "Processing and nuclear localization of CRMP2 during brain development induce neurite outgrowth inhibition," *J. Biol. Chem.*, vol. 283, no. 21, pp. 14751–14761, 2008.
- [444] S. X. Jiang, J. Kappler, B. Zurakowski, A. Desbois, A. Aylsworth, and S. T. Hou, "Calpain cleavage of collapsin response mediator proteins in ischemic mouse brain," *Eur. J. Neurosci.*, vol. 26, no. 4, pp. 801–809, 2007.
- [445] Z. Zhang, A. K. Ottens, S. Sadasivan, F. H. Kobeissy, T. Fang, R. L. Hayes, and K. K. W. Wang, "Calpain-Mediated Collapsin Response Mediator Protein-1, -2, And -4 Proteolysis after Neurotoxic And Traumatic Brain Injury," *J. Neurotrauma*, vol. 24, no. 3, pp. 460–472, 2007.
- [446] K. Taghian, J. Y. Lee, and S. Petratos, "Phosphorylation and Cleavage of the Family of Collapsin Response Mediator Proteins May Play a Central Role in Neurodegeneration after CNS Trauma," *J. Neurotrauma*, vol. 29, no. 9, pp. 1728–1735, 2012.
- [447] J.-N. Zhang and J. C. Koch, "Collapsin response mediator protein-2 plays a major protective role in acute axonal degeneration.," *Neural Regen. Res.*, vol. 12, no. 5, pp. 692–695, 2017.
- [448] Y. Zheng, R. Sethi, L. S. Mangala, C. Taylor, J. Goldsmith, M. Wang, K. Masuda, M. Karaminejdranjbar, D. Mannion, F. Miranda, S. Herrero-Gonzalez, K. Hellner, F. Chen, A. Alsaadi, A. Albukhari, D. C. Fotso, C. Yau, D. Jiang, S. Pradeep, C. Rodriguez-Aguayo, G. Lopez-Berestein, S. Knapp, N. S. Gray, L. Campo, K. A. Myers, S. Dhar, D. Ferguson, R. C. Bast, A. K. Sood, F. von Delft, A. A. Ahmed, and A. A. Ahmed, "Tuning microtubule dynamics to enhance cancer therapy by modulating FER-mediated CRMP2 phosphorylation.," *Nat. Commun.*, vol. 9, no. 1, p. 476, 2018.
- [449] S. X. Jiang, J. Kappler, B. Zurakowski, A. Desbois, A. Aylsworth, and S. T. Hou, "Calpain cleavage of collapsin response mediator proteins in ischemic mouse brain," *Eur. J. Neurosci.*, vol. 26, no. 4, pp. 801–809, 2007.
- [450] S. Bretin, V. Rogemond, P. Marin, M. Maus, Y. Torrens, J. Honnorat, J. Glowinski, J. Prémont, and C. Gauchy, "Calpain product of WT-CRMP2 reduces the amount of surface NR2B NMDA receptor subunit," *J. Neurochem.*, vol. 98, no. 4, pp. 1252–1265, 2006.
- [451] S. T. Hou, S. X. Jiang, A. Aylsworth, G. Ferguson, J. Slinn, H. Hu, T. Leung, J. Kappler, and K. Kaibuchi, "CaMKII phosphorylates collapsin response mediator protein 2 and modulates axonal damage during glutamate excitotoxicity," *J. Neurochem.*, vol. 111, no. 3, pp. 870–881, 2009.
- [452] K. Vosseller, K. C. Hansen, R. J. Chalkley, J. C. Trinidad, L. Wells, G. W. Hart, and A. L. Burlingame, "Quantitative analysis of both protein expression and serine/threonine post-translational modifications through stable isotope labeling with dithiothreitol," *Proteomics*, vol. 5, no. 2, pp. 388–398, 2005.
- [453] Y. Zheng, R. Sethi, L. S. Mangala, C. Taylor, J. Goldsmith, M. Wang, K. Masuda, M. Karaminejdranjbar, D. Mannion, F. Miranda, S. Herrero-Gonzalez, K. Hellner, F. Chen, A. Alsaadi, A. Albukhari, D. C. Fotso, C. Yau, D. Jiang, S. Pradeep, C. Rodriguez-Aguayo, G. Lopez-Berestein, and S. Knapp, "Tuning microtubule dynamics to enhance cancer therapy by modulating FER-mediated CRMP2 phosphorylation.," *Nat. Commun.*, vol. 9, no. 1, p. 476, 2018.
- [454] T. Yoshimura, Y. Kawano, N. Arimura, S. Kawabata, A. Kikuchi, and K. Kaibuchi, "GSK-3beta regulates phosphorylation of CRMP-2 and neuronal polarity.," *Cell*, vol. 120, no. 1, pp. 137–49,

- 2005.
- [455] N. Arimura, N. Inagaki, K. Chihara, C. Menager, N. Nakamura, M. Amano, A. Iwamatsu, Y. Goshima, and K. Kaibuchi, "Phosphorylation of Collapsin Response Mediator Protein-2 by Rho-kinase: evidence for two separate signaling pathways for growth cone collapse," *J. Biol. Chem.*, vol. 275, no. 31, pp. 23973–23980, 2000.
- [456] N. Arimura, C. Menager, Y. Kawano, T. Yoshimura, S. Kawabata, A. Hattori, Y. Fukata, M. Amano, Y. Goshima, M. Inagaki, N. Morone, J. Usukura, and K. Kaibuchi, "Phosphorylation by Rho Kinase Regulates CRMP-2 Activity in Growth Cones," *Mol. Cell. Biol.*, vol. 25, no. 22, pp. 9973–9984, 2005.
- [457] N. Yamashita, T. Ohshima, F. Nakamura, P. Kolattukudy, J. Honnorat, K. Mikoshiba, and Y. Goshima, "Phosphorylation of CRMP2 (collapsin response mediator protein 2) is involved in proper dendritic field organization.," *J. Neurosci.*, vol. 32, no. 4, pp. 1360–5, 2012.
- [458] M. V. Astle, L. M. Ooms, A. R. Cole, L. C. Binge, J. M. Dyson, M. J. Layton, S. Petratos, C. Sutherland, and C. A. Mitchell, "Identification of a Proline-rich Inositol Polyphosphate 5-Phosphatase (PIPP)-Collapsin Response Mediator Protein 2 (CRMP2) Complex That Regulates Neurite Elongation," *J. Biol. Chem.*, vol. 286, no. 26, pp. 23407–23418, 2011.
- [459] L.-Q. Zhu, H.-Y. Zheng, C.-X. Peng, D. Liu, H.-L. Li, Q. Wang, and J.-Z. Wang, "Protein phosphatase 2A facilitates axonogenesis by dephosphorylating CRMP2.," *J. Neurosci.*, vol. 30, no. 10, pp. 3839–48, 2010.
- [460] A. R. Cole, M. P. M. Soutar, M. Rembutsu, L. van Aalten, C. J. Hastie, H. Mclauchlan, M. Peggie, M. Balastik, K. P. Lu, and C. Sutherland, "Relative Resistance of Cdk5-phosphorylated CRMP2 to Dephosphorylation," *J. Biol. Chem.*, vol. 283, no. 26, pp. 18227–18237, 2008.
- [461] T. Sumi, T. Imasaki, M. Aoki, N. Sakai, E. Nitta, M. Shirouzu, and R. Nitta, "Structural Insights into the Altering Function of CRMP2 by Phosphorylation," *Cell Struct. Funct.*, vol. 43, no. 1, pp. 15–23, 2018.
- [462] R. N. Cole and G. W. Hart, "Cytosolic O-glycosylation is abundant in nerve terminals.," *J. Neurochem.*, vol. 79, no. 5, pp. 1080–9, 2001.
- [463] K. Kanninen, G. Goldsteins, S. Auriola, I. Alafuzoff, and J. Koistinaho, "Glycosylation changes in Alzheimer's disease as revealed by a proteomic approach," *Neurosci. Lett.*, vol. 367, no. 2, pp. 235–240, 2004.
- [464] S. Brenner, "The genetics of *Caenorhabditis elegans*," *Genetics*, vol. 77, no. 1, pp. 71–94, 1974.
- [465] D. Tsuboi, T. Hikita, H. Qadota, M. Amano, and K. Kaibuchi, "Regulatory machinery of UNC-33 Ce-CRMP localization in neurites during neuronal development in *Caenorhabditis elegans*," *J. Neurochem.*, vol. 95, no. 6, pp. 1629–1641, 2005.
- [466] Y. Sun, T. Fei, T. Yang, F. Zhang, Y.-G. Chen, H. Li, and Z. Xu, "The Suppression of CRMP2 Expression by Bone Morphogenetic Protein (BMP)-SMAD Gradient Signaling Controls Multiple Stages of Neuronal Development," *J. Biol. Chem.*, vol. 285, no. 50, pp. 39039–39050, 2010.
- [467] Y. Kodama, Y. Murakumo, M. Ichihara, K. Kawai, Y. Shimono, and M. Takahashi, "Induction of

Bibliographie

- CRMP-2 by GDNF and analysis of the CRMP-2 promoter region," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 320, no. 1, pp. 108–115, 2004.
- [468] L. H. Wang and S. M. Strittmatter, "A family of rat CRMP genes is differentially expressed in the nervous system.," *J. Neurosci.*, vol. 16, no. 19, pp. 6197–207, 1996.
- [469] J. E. Minturn, D. H. Geschwind, H. J. L. Fryer, and S. Hockfield, "Early postmitotic neurons transiently express TOAD-64, a neural specific protein," *J. Comp. Neurol.*, vol. 355, no. 3, pp. 369–379, 1995.
- [470] D. Ricard, B. Stankoff, D. Bagnard, M. Aguera, V. Rogemond, J. C. Antoine, N. Spassky, B. Zalc, C. Lubetzki, M. F. Belin, and J. Honnorat, "Differential Expression of Collapsin Response Mediator Proteins (CRMP/ULIP) in Subsets of Oligodendrocytes in the Postnatal Rodent Brain," *Mol. Cell. Neurosci.*, vol. 16, no. 4, pp. 324–337, 2000.
- [471] R. J. Pasterkamp, F. De Winter, A. J. Holtmaat, and J. Verhaagen, "Evidence for a role of the chemorepellent semaphorin III and its receptor neuropilin-1 in the regeneration of primary olfactory axons.," *J. Neurosci.*, vol. 18, no. 23, pp. 9962–76, 1998.
- [472] J. Nacher, D. R. Rosell, and B. S. McEwen, "Widespread expression of rat collapsin response-mediated protein 4 in the telencephalon and other areas of the adult rat central nervous system.," *J. Comp. Neurol.*, vol. 424, no. 4, pp. 628–39, 2000.
- [473] A. R. Cole, W. Noble, L. van Aalten, F. Plattner, R. Meimaridou, D. Hogan, M. Taylor, J. LaFrancois, F. Gunn-Moore, A. Verkhratsky, S. Oddo, F. LaFerla, K. P. Giese, K. T. Dineley, K. Duff, J. C. Richardson, S. Du Yan, D. P. Hanger, S. M. Allan, and C. Sutherland, "Collapsin response mediator protein-2 hyperphosphorylation is an early event in Alzheimer's disease progression," *J. Neurochem.*, vol. 103, no. 3, pp. 1132–1144, 2007.
- [474] M. Medina and J. Avila, "New insights into the role of glycogen synthase kinase-3 in Alzheimer's disease," *Expert Opin. Ther. Targets*, vol. 18, no. 1, pp. 69–77, 2014.
- [475] A. Barzilai, R. Zilkha-Falb, D. Daily, N. Stern, D. Offen, I. Ziv, E. Melamed, and A. Shirvan, "The molecular mechanism of dopamine-induced apoptosis: identification and characterization of genes that mediate dopamine toxicity.," *J. Neural Transm. Suppl.*, no. 60, pp. 59–76, 2000.
- [476] W. Fang, G. Gao, H. Zhao, Y. Xia, X. Guo, N. Li, Y. Li, Y. Yang, L. Chen, Q. Wang, and L. Li, "Role of the Akt/GSK-3 β /CRMP-2 pathway in axon degeneration of dopaminergic neurons resulting from MPP+ toxicity," *Brain Res.*, vol. 1602, pp. 9–19, 2015.
- [477] Y. Liu, X. Pham, L. Zhang, P.-L. Chen, G. Burzynski, D. M. McGaughey, S. He, J. A. McGrath, P. Wolyniec, M. D. Fallin, M. S. Pierce, A. S. McCallion, A. E. Pulver, D. Avramopoulos, and D. Valle, "Functional variants in DPYSL2 sequence increase risk of schizophrenia and suggest a link to mTOR signaling.," *G3 (Bethesda)*, vol. 5, no. 1, pp. 61–72, 2014.
- [478] T. T. Quach, J. Honnorat, P. E. Kolattukudy, R. Khanna, and A. M. Duchemin, "CRMPs: Critical molecules for neurite morphogenesis and neuropsychiatric diseases," *Mol. Psychiatry*, vol. 20, no. 9, pp. 1037–1045, 2015.
- [479] N. L. Johnston-Wilson, C. D. Sims, J.-P. Hofmann, L. Anderson, A. D. Shore, E. F. Torrey, and R. H. Yolken, "Disease-specific alterations in frontal cortex brain proteins in schizophrenia, bipolar

- disorder and major depressive disorder," *Mol. Psychiatry*, vol. 5, no. 2, pp. 142–149, 2000.
- [480] J. J. Dimatelis, D. J. Stein, and V. A. Russell, "Chronic Exposure to Light Reverses the Effect of Maternal Separation on Proteins in the Prefrontal Cortex," *J. Mol. Neurosci.*, vol. 51, no. 3, pp. 835–843, 2013.
- [481] M. Föcking, P. Dicker, J. A. English, K. O. Schubert, M. J. Dunn, and D. R. Cotter, "Common Proteomic Changes in the Hippocampus in Schizophrenia and Bipolar Disorder and Particular Evidence for Involvement of Cornu Ammonis Regions 2 and 3," *Arch. Gen. Psychiatry*, vol. 68, no. 5, p. 477, 2011.
- [482] L. Doan, "Voltage-gated calcium channels and pain," *Tech. Reg. Anesth. Pain Manag.*, vol. 14, no. 2, pp. 42–47, 2010.
- [483] T. Czech, J.-W. Yang, E. Csaszar, J. Kappler, C. Baumgartner, and G. Lubec, "Reduction of hippocampal collapsin response mediated protein-2 in patients with mesial temporal lobe epilepsy.," *Neurochem. Res.*, vol. 29, no. 12, pp. 2189–96, 2004.
- [484] Y. Wang, J. M. Brittain, B. W. Jarecki, K. D. Park, S. M. Wilson, B. Wang, R. Hale, S. O. Meroueh, T. R. Cummins, and R. Khanna, "In silico docking and electrophysiological characterization of lacosamide binding sites on collapsin response mediator protein-2 identifies a pocket important in modulating sodium channel slow inactivation.," *J. Biol. Chem.*, vol. 285, no. 33, pp. 25296–307, 2010.
- [485] F. Shinkai-Ouchi, Y. Yamakawa, H. Hara, M. Tobiume, M. Nishijima, K. Hanada, and K. Hagiwara, "Identification and structural analysis of C-terminally truncated collapsin response mediator protein-2 in a murine model of prion diseases.," *Proteome Sci.*, vol. 8, p. 53, 2010.
- [486] J. Castilla, A. Gutiérrez-Adán, A. Brun, D. Doyle, B. Pintado, M. A. Ramírez, F. J. Salguero, B. Parra, F. D. S. Segundo, J. M. Sánchez-Vizcaíno, M. Rogers, and J. M. Torres, "Subclinical Bovine Spongiform Encephalopathy Infection in Transgenic Mice Expressing Porcine Prion Protein," *J. Neurosci.*, vol. 24, no. 21, pp. 5063–5069, 2004.
- [487] K. K.-W. Li, Y. Qi, T. Xia, Y. Yao, L. Zhou, K.-M. Lau, and H.-K. Ng, "CRMP1 Inhibits Proliferation of Medulloblastoma and Is Regulated by HMGA1," *PLoS One*, vol. 10, no. 5, p. e0127910, 2015.
- [488] L. Ren, F. Li, M. Di, Y. Fu, Y. Hui, G. Xiao, Q. Sun, Y. Liu, D. Ren, and X. Du, "MicroRNA-187 regulates gastric cancer progression by targeting the tumor suppressor CRMP1," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 482, no. 4, pp. 597–603, 2017.
- [489] G. Cai, D. Wu, Z. Wang, Z. Xu, K.-B. Wong, C.-F. Ng, F. L. Chan, and S. Yu, "Collapsin response mediator protein-1 (CRMP1) acts as an invasion and metastasis suppressor of prostate cancer via its suppression of epithelial-mesenchymal transition and remodeling of actin cytoskeleton organization.," *Oncogene*, vol. 36, no. 4, pp. 546–558, 2017.
- [490] J.-Y. Shih, S.-C. Yang, T.-M. Hong, A. Yuan, J. J. W. Chen, C.-J. Yu, Y.-L. Chang, Y.-C. Lee, K. Peck, C.-W. Wu, and P.-C. Yang, "Collapsin Response Mediator Protein-1 and the Invasion and Metastasis of Cancer Cells," *JNCI J. Natl. Cancer Inst.*, vol. 93, no. 18, pp. 1392–1400, 2001.
- [491] J. Mukherjee, L. V. DeSouza, J. Micallef, Z. Karim, S. Croul, K. W. M. Siu, and A. Guha, "Loss of collapsin response mediator protein1, as detected by iTRAQ analysis, promotes invasion of

- human gliomas expressing mutant EGFRvIII," *Cancer Res.*, vol. 69, no. 22, pp. 8545–8554, 2009.
- [492] A. Moutal, L. S. Villa, S. K. Yeon, K. T. Householder, K. D. Park, R. W. Sirianni, and R. Khanna, "CRMP2 Phosphorylation Drives Glioblastoma Cell Proliferation," *Mol. Neurobiol.*, pp. 1–14, 2017.
- [493] C. Couderc, J. Bollard, Y. Couté, P. Massoma, G. Poncet, F. Lepinasse, V. Hervieu, N. Gadot, J.-C. Sanchez, J.-Y. Scoazec, J.-J. Diaz, and C. Roche, "Mechanisms of local invasion in enteroendocrine tumors: Identification of novel candidate cytoskeleton-associated proteins in an experimental mouse model by a proteomic approach and validation in human tumors.," *Mol. Cell. Endocrinol.*, vol. 399, pp. 154–63, 2015.
- [494] K. Shimada, T. Ishikawa, F. Nakamura, D. Shimizu, T. Chishima, Y. Ichikawa, T. Sasaki, I. Endo, Y. Nagashima, and Y. Goshima, "Collapsin response mediator protein 2 is involved in regulating breast cancer progression.," *Breast Cancer*, vol. 21, no. 6, pp. 715–23, 2014.
- [495] E. Oliemuller, R. Peláez, S. Garasa, M. J. Pajares, J. Agorreta, R. Pío, L. M. Montuenga, A. Teixeira, S. Llanos, and A. Rouzaut, "Phosphorylated tubulin adaptor protein CRMP-2 as prognostic marker and candidate therapeutic target for NSCLC," *Int. J. Cancer*, vol. 132, pp. 1986–1995, 2013.
- [496] N. J. Grant, P. J. Coates, Y. L. Woods, S. E. Bray, N. A. Morrice, C. J. Hastie, D. J. Lamont, F. A. Carey, and C. Sutherland, "Phosphorylation of a splice variant of collapsin response mediator protein 2 in the nucleus of tumour cells links cyclin dependent kinase-5 to oncogenesis.," *BMC Cancer*, vol. 15, no. 1, p. 885, 2015.
- [497] C. C. Wu, H. C. Chen, S. J. Chen, H. P. Liu, Y. Y. Hsieh, C. J. Yu, R. Tang, L. L. Hsieh, J. S. Yu, and Y. S. Chang, "Identification of collapsin response mediator protein-2 as a potential marker of colorectal carcinoma by comparative analysis of cancer cell secretomes," *Proteomics*, vol. 8, no. 2, pp. 316–332, 2008.
- [498] V. Rosslenbroich, L. Dai, S. L. Baader, A. A. Noegel, V. Gieselmann, and J. Kappler, "Collapsin response mediator protein-4 regulates F-actin bundling," vol. 310, pp. 434–444, 2005.
- [499] X. Gao, Y.-H. Mao, C. Xiao, K. Li, W. Liu, L.-Y. Li, and J. Pang, "Calpain-2 triggers prostate cancer metastasis via enhancing CRMP4 promoter methylation through NF- κ B/DNMT1 signaling pathway," *Prostate*, vol. 78, no. 9, pp. 682–690, 2018.
- [500] Z. Chen, Q. Liang, J. Wang, Q.-X. Huang, J. Chen, Z. Weng, C. Shao, X. Gao, and J. Pang, "Collapsin response mediator protein 4 promoter methylation level as a potential predictor for diagnosing primary malignant lymphoma of the prostate," *Cancer Cell Int.*, vol. 18, no. 1, p. 3, 2018.
- [501] B. Li and C. Li, "Suppression of Prostate Cancer Metastasis by DPYSL3-Targeted saRNA," in *Advances in experimental medicine and biology*, vol. 983, 2017, pp. 207–216.
- [502] Y. Zhou, R. Li, H. Yu, R. Wang, and Z. Shen, "microRNA-130a is an oncomir suppressing the expression of CRMP4 in gastric cancer," *Onco. Targets. Ther.*, vol. Volume 10, pp. 3893–3905, 2017.
- [503] S. Chen, X. Zhang, J. Peng, E. Zhai, Y. He, H. Wu, C. Chen, J. Ma, Z. Wang, and S. Cai, "VEGF promotes gastric cancer development by upregulating CRMP4," *Oncotarget*, vol. 7, no. 13, pp. 17074–86, 2016.

- [504] S. Sato, F. Nakamura, Y. Hiroshima, Y. Nagashima, I. Kato, N. Yamashita, Y. Goshima, and I. Endo, "Caerulein-induced pancreatitis augments the expression and phosphorylation of collapsin response mediator protein 4," *J. Hepatobiliary. Pancreat. Sci.*, vol. 23, no. 7, pp. 422–431, 2016.
- [505] Y. Hiroshima, F. Nakamura, H. Miyamoto, R. Mori, K. Taniguchi, R. Matsuyama, H. Akiyama, K. Tanaka, Y. Ichikawa, S. Kato, N. Kobayashi, K. Kubota, Y. Nagashima, Y. Goshima, and I. Endo, "Collapsin Response Mediator Protein 4 Expression is Associated with Liver Metastasis and Poor Survival in Pancreatic Cancer," *Ann. Surg. Oncol.*, vol. 20, no. S3, pp. 369–378, 2013.
- [506] A. Moutal, J. Honnorat, P. Massoma, P. Desormeaux, C. Bertrand, C. Malleval, C. Watrin, N. Chounlamountri, M.-E. Mayeur, R. Besancon, N. Naudet, L. Magadoux, R. Khanna, F. Ducray, D. Meyronet, and N. Thomasset, "CRMP5 Controls Glioblastoma Cell Proliferation and Survival through Notch-Dependent Signaling," *Cancer Res.*, vol. 75, no. 17, pp. 3519–3528, 2015.
- [507] S. Brot, C. Malleval, C. Benetollo, C. Auger, D. Meyronet, V. Rogemond, J. Honnorat, and M. Moradi-Améli, "Identification of a new CRMP5 isoform present in the nucleus of cancer cells and enhancing their proliferation," *Exp. Cell Res.*, vol. 319, no. 5, pp. 588–599, 2013.
- [508] D. Meyronet, P. Massoma, F. Thivolet, L. Chalabreysse, V. Rogemond, A. Schlama, J. Honnorat, and N. Thomasset, "Extensive Expression of Collapsin Response Mediator Protein 5 (CRMP5) is a Specific Marker of High-grade Lung Neuroendocrine Carcinoma," *Am. J. Surg. Pathol.*, vol. 32, no. 11, pp. 1699–1708, 2008.
- [509] D. Dubey, V. A. Lennon, A. Gadoth, S. J. Pittock, E. P. Flanagan, J. E. Schmeling, A. McKeon, and C. J. Klein, "Autoimmune CRMP5 neuropathy phenotype and outcome defined from 105 cases," *Neurology*, vol. 90, no. 2, pp. e103–e110, 2018.
- [510] C. Werry, F. Götz, U. Wurster, M. Stangel, R. Giess, F. Heidenreich, and A. Windhagen, "Paraneoplastic autoimmune encephalitis associated with CV2/CRMP-5 IgG antineuronal antibodies in a patient with thymoma.," *J. Neurol.*, vol. 256, no. 1, pp. 129–31, 2009.
- [511] A. Aliprandi, A. Terruzzi, A. Rigamonti, E. Bazzigaluppi, L. Tremolizzo, C. Ferrarese, and A. Salmaggi, "Paraneoplastic cerebellar degeneration with anti-CV2/CRMP5 antibodies and prostate adenocarcinoma," *Neurol. Sci.*, vol. 36, no. 8, pp. 1501–1503, 2015.
- [512] M. Lawal, F. A. Olotu, and M. E. S. Soliman, "Across the blood-brain barrier: Neurotherapeutic screening and characterization of Naringenin as a novel CRMP-2 inhibitor in the treatment of Alzheimer's disease using bioinformatics and computational tools," *Comput. Biol. Med.*, vol. 98, pp. 168–177, 2018.
- [513] S. M. Wilson and R. Khanna, "Specific binding of lacosamide to collapsin response mediator protein 2 (CRMP2) and direct impairment of its canonical function: implications for the therapeutic potential of lacosamide.," *Mol. Neurobiol.*, vol. 51, no. 2, pp. 599–609, 2015.
- [514] A. Moutal, L. François-Moutal, S. Perez-Miller, K. Cottier, L. A. Chew, S. K. Yeon, J. Dai, K. D. Park, M. Khanna, and R. Khanna, "(S)-Lacosamide Binding to Collapsin Response Mediator Protein 2 (CRMP2) Regulates CaV2.2 Activity by Subverting Its Phosphorylation by Cdk5," *Mol. Neurobiol.*, vol. 53, no. 3, pp. 1959–1976, 2016.
- [515] A. Moutal, N. Eyde, E. Telemi, K. D. Park, J. Y. Xie, D. W. Dodick, F. Porreca, and R. Khanna, "Efficacy of (S)-Lacosamide in preclinical models of cephalic pain.," *Pain reports*, vol. 1, no. 1,

- 2016.
- [516] A. Moutal, L. A. Chew, X. Yang, Y. Wang, S. K. Yeon, E. Telemi, S. Meroueh, K. D. Park, R. Shrinivasan, K. B. Gilbraith, C. Qu, J. Y. Xie, A. Patwardhan, T. W. Vanderah, M. Khanna, F. Porreca, and R. Khanna, "(S)-lacosamide inhibition of CRMP2 phosphorylation reduces postoperative and neuropathic pain behaviors through distinct classes of sensory neurons identified by constellation pharmacology.," *Pain*, vol. 157, no. 7, pp. 1448–63, 2016.
- [517] A. Moutal, X. Yang, W. Li, K. B. Gilbraith, S. Luo, S. Cai, L. François-Moutal, L. A. Chew, S. K. Yeon, S. S. Bellampalli, C. Qu, J. Y. Xie, M. M. Ibrahim, M. Khanna, K. D. Park, F. Porreca, and R. Khanna, "CRISPR/Cas9 editing of Nf1 gene identifies CRMP2 as a therapeutic target in neurofibromatosis type 1-related pain that is reversed by (S)-Lacosamide," *Pain*, vol. 158, no. 12, pp. 2301–2319, 2017.
- [518] J. Y. Xie, L. A. Chew, X. Yang, Y. Wang, C. Qu, Y. Wang, L. M. Federici, S. D. Fitz, M. S. Ripsch, M. R. Due, A. Moutal, M. Khanna, F. A. White, T. W. Vanderah, P. L. Johnson, F. Porreca, and R. Khanna, "Sustained relief of ongoing experimental neuropathic pain by a CRMP2 peptide aptamer with low abuse potential," *Pain*, vol. 157, no. 9, pp. 2124–2140, 2016.
- [519] A. Moutal, Y. Wang, X. Yang, Y. Ji, S. Luo, A. Dorame, S. S. Bellampalli, L. A. Chew, S. Cai, E. T. Dustrude, J. E. Keener, M. T. Marty, T. W. Vanderah, and R. Khanna, "Dissecting the role of the CRMP2–neurofibromin complex on pain behaviors," *Pain*, vol. 158, no. 11, pp. 2203–2221, 2017.
- [520] X. Khawaja, J. Xu, J.-J. Liang, and J. E. Barrett, "Proteomic analysis of protein changes developing in rat hippocampus after chronic antidepressant treatment: Implications for depressive disorders and future therapies," *J. Neurosci. Res.*, vol. 75, no. 4, pp. 451–460, 2004.
- [521] K. Hensley, K. Venkova, A. Christov, W. Gunning, and J. Park, "Collapsin response mediator protein-2: An emerging pathologic feature and therapeutic target for neurodegeneration indications," *Mol. Neurobiol.*, vol. 43, no. 3, pp. 180–191, 2011.
- [522] S. Kedracka-Krok, B. Swiderska, U. Jankowska, B. Skupien-Rabian, J. Solich, K. Buczak, and M. Dziedzicka-Wasylewska, "Clozapine influences cytoskeleton structure and calcium homeostasis in rat cerebral cortex and has a different proteomic profile than risperidone," *J. Neurochem.*, vol. 132, no. 6, pp. 657–676, 2015.
- [523] K. Hensley, A. Christov, S. Kamat, X. C. Zhang, K. W. Jackson, S. Snow, and J. Post, "Proteomic Identification of Binding Partners for the Brain Metabolite Lanthionine Ketimine (LK) and Documentation of LK Effects on Microglia and Motoneuron Cell Cultures," *J. Neurosci.*, vol. 30, no. 8, pp. 2979–2988, 2010.
- [524] J. L. Dupree, P. E. Polak, K. Hensley, D. Pelligrino, and D. L. Feinstein, "Lanthionine ketimine ester provides benefit in a mouse model of multiple sclerosis," *J. Neurochem.*, vol. 134, no. 2, pp. 302–314, 2015.
- [525] I. Kuperstein, D. P. A. Cohen, S. Pook, E. Viara, L. Calzone, E. Barillot, and A. Zinovyev, "NaviCell: a web-based environment for navigation, curation and maintenance of large molecular interaction maps.," *BMC Syst. Biol.*, vol. 7, p. 100, 2013.
- [526] H. Kitano, A. Funahashi, Y. Matsuoka, and K. Oda, "Using process diagrams for the graphical representation of biological networks," *Nat. Biotechnol.*, vol. 23, no. 8, pp. 961–966, 2005.

- [527] E. Demir, M. P. Cary, S. Paley, K. Fukuda, C. Lemer, I. Vastrik, G. Wu, P. D'Eustachio, C. Schaefer, J. Luciano, F. Schacherer, I. Martinez-Flores, Z. Hu, V. Jimenez-Jacinto, G. Joshi-Tope, K. Kandasamy, A. C. Lopez-Fuentes, H. Mi, E. Pichler, I. Rodchenkov, A. Splendiani, S. Tkachev, J. Zucker, G. Gopinath, H. Rajasimha, R. Ramakrishnan, I. Shah, M. Syed, N. Anwar, Ö. Babur, M. Blinov, E. Brauner, D. Corwin, S. Donaldson, F. Gibbons, R. Goldberg, P. Hornbeck, A. Luna, P. Murray-Rust, E. Neumann, O. Ruebenacker, M. Samwald, M. van Iersel, S. Wimalaratne, K. Allen, B. Braun, M. Whirl-Carrillo, K.-H. Cheung, K. Dahlquist, A. Finney, M. Gillespie, E. Glass, L. Gong, R. Haw, M. Honig, O. Hubaut, D. Kane, S. Krupa, M. Kutmon, J. Leonard, D. Marks, D. Merberg, V. Petri, A. Pico, D. Ravenscroft, L. Ren, N. Shah, M. Sunshine, R. Tang, R. Whaley, S. Letovksy, K. H. Buetow, A. Rzhetsky, V. Schachter, B. S. Sobral, U. Dogrusoz, S. McWeeney, M. Aladjem, E. Birney, J. Collado-Vides, S. Goto, M. Hucka, N. Le Novère, N. Maltsev, A. Pandey, P. Thomas, E. Wingender, P. D. Karp, C. Sander, G. D. Bader, and G. D. Bader, "The BioPAX community standard for pathway data sharing," *Nat. Biotechnol.*, vol. 28, no. 9, pp. 935–942, Sep. 2010.
- [528] M. Kondratova, N. Sompairac, E. Barillot, A. Zinovyev, and I. Kuperstein, "Signalling maps in cancer research: construction and data analysis.," *Database (Oxford)*, vol. 2018, 2018.
- [529] I. Kuperstein, E. Bonnet, H.-A. Nguyen, D. Cohen, E. Viara, L. Grieco, S. Fourquet, L. Calzone, C. Russo, M. Kondratova, M. Dutreix, E. Barillot, and A. Zinovyev, "Atlas of Cancer Signalling Network: a systems biology resource for integrative analysis of cancer data with Google Maps.," *Oncogenesis*, vol. 4, no. 7, p. e160, 2015.
- [530] E. Bonnet, L. Calzone, D. Rovera, G. Stoll, E. Barillot, and A. Zinovyev, "BiNoM 2.0, a Cytoscape plugin for accessing and analyzing pathways using standard systems biology formats.," *BMC Syst. Biol.*, vol. 7, p. 18, 2013.
- [531] R. L. Barnhill, M. Ye, A. Batistella, M.-H. Stern, S. Roman-Roman, R. Dendale, O. Lantz, S. Piperno-Neumann, L. Desjardins, N. Cassoux, and C. Lugassy, "The biological and prognostic significance of angiotropism in uveal melanoma," *Lab. Investig.*, vol. 97, no. 6, pp. 746–759, 2017.
- [532] M. A. Economou, C. All-Ericsson, V. Bykov, L. Girnita, A. Bartolazzi, O. Larsson, and S. Seregard, "Receptors for the Liver Synthesized Growth Factors IGF-1 and HGF/SF in Uveal Melanoma: Intercorrelation and Prognostic Implications," *Investig. Ophthalmology Vis. Sci.*, vol. 46, no. 12, p. 4372, 2005.
- [533] F. P. Gardner, D. J. Serie, D. R. Salomao, K. J. Wu, S. N. Markovic, J. S. Pulido, and R. W. Joseph, "c-MET expression in primary and liver metastases in uveal melanoma," *Melanoma Res.*, vol. 24, no. 6, pp. 617–620, 2014.
- [534] H. Li, W. Yang, P. W. Chen, H. Alizadeh, and J. Y. Niederkorn, "Inhibition of Chemokine Receptor Expression on Uveal Melanomas by CXCR4 siRNA and Its Effect on Uveal Melanoma Liver Metastases," *Investig. Ophthalmology Vis. Sci.*, vol. 50, no. 12, p. 5522, 2009.
- [535] P. S. Leventhal and E. L. Feldman, "Insulin-like Growth Factors as Regulators of Cell Motility Signaling Mechanisms.," *Trends Endocrinol. Metab.*, vol. 8, no. 1, pp. 1–6, 1997.
- [536] D. Zhang, M. Bar-Eli, S. Meloche, and P. Brodt, "Dual Regulation of MMP-2 Expression by the Type 1 Insulin-like Growth Factor Receptor," *J. Biol. Chem.*, vol. 279, no. 19, pp. 19683–19690, 2004.
- [537] C. All-Ericsson, L. Girnita, S. Seregard, A. Bartolazzi, M. J. Jager, and O. Larsson, "Insulin-like

- growth factor-1 receptor in uveal melanoma: a predictor for metastatic disease and a potential therapeutic target.," *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, vol. 43, no. 1, pp. 1–8, 2002.
- [538] A. Girnita, C. All-Ericsson, M. A. Economou, K. Åström, M. Axelson, S. Seregard, O. Larsson, and L. Girnita, "The insulin-like growth factor-I receptor inhibitor picropodophyllin causes tumor regression and attenuates mechanisms involved in invasion of uveal melanoma cells," *Acta Ophthalmol.*, vol. 86, no. thesis4, pp. 26–34, 2008.
- [539] D. P. Bottaro, J. S. Rubin, D. L. Faletto, A. M. Chan, T. E. Kmiecik, G. F. Vande Woude, and S. A. Aaronson, "Identification of the hepatocyte growth factor receptor as the c-met proto-oncogene product.," *Science*, vol. 251, no. 4995, pp. 802–4, 1991.
- [540] K. A. Furge, Y.-W. Zhang, and G. F. Vande Woude, "Met receptor tyrosine kinase: enhanced signaling through adapter proteins," *Oncogene*, vol. 19, no. 49, pp. 5582–5589, 2000.
- [541] C. Birchmeier, W. Birchmeier, E. Gherardi, and G. F. Vande Woude, "Met, metastasis, motility and more," *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 4, no. 12, pp. 915–925, 2003.
- [542] Y.-W. Zhang and G. F. Vande Woude, "HGF/SF-met signaling in the control of branching morphogenesis and invasion," *J. Cell. Biochem.*, vol. 88, no. 2, pp. 408–417, 2003.
- [543] B. Peruzzi and D. P. Bottaro, "Targeting the c-Met Signaling Pathway in Cancer," *Clin. Cancer Res.*, vol. 12, no. 12, pp. 3657–3660, 2006.
- [544] K. Yasumoto, K. Koizumi, A. Kawashima, Y. Saitoh, Y. Arita, K. Shinohara, T. Minami, T. Nakayama, H. Sakurai, Y. Takahashi, O. Yoshie, and I. Saiki, "Role of the CXCL12/CXCR4 Axis in Peritoneal Carcinomatosis of Gastric Cancer," *Cancer Res.*, vol. 66, no. 4, pp. 2181–2187, 2006.
- [545] S. Di Cesare, J.-C. Marshall, P. Logan, E. Anteckka, D. Faingold, S. C. Maloney, and M. N. Burnier, "Expression and migratory analysis of 5 human uveal melanoma cell lines for CXCL12, CXCL8, CXCL1, and HGF.," *J. Carcinog.*, vol. 6, p. 2, 2007.
- [546] S. Scala, C. Ieranò, A. Ottaiano, R. Franco, A. La Mura, G. Liguori, M. Mascolo, S. Staibano, P. A. Ascierto, G. Botti, G. De Rosa, and G. Castello, "CXC chemokine receptor 4 is expressed in uveal malignant melanoma and correlates with the epithelioid-mixed cell type," *Cancer Immunol. Immunother.*, vol. 56, no. 10, pp. 1589–1595, 2007.
- [547] S. S. P. Giridharan, B. Cai, N. Naslavsky, and S. Caplan, "Trafficking cascades mediated by Rab35 and its membrane hub effector, MICAL-L1," *Commun. Integr. Biol.*, vol. 5, no. 4, pp. 384–387, 2012.
- [548] C. D. Walls, A. Iliuk, Y. Bai, M. Wang, W. A. Tao, and Z.-Y. Zhang, "Phosphatase of Regenerating Liver 3 (PRL3) Provokes a Tyrosine Phosphoproteome to Drive Prometastatic Signal Transduction," *Mol. Cell. Proteomics*, vol. 12, no. 12, pp. 3759–3777, 2013.
- [549] S. Pellegrin, H. Mellor, P. Barry, P. Andrews, and J. V Jester, "Actin stress fibres.," *J. Cell Sci.*, vol. 120, no. Pt 20, pp. 3491–9, 2007.
- [550] S. Maacha, O. Anezo, M. Foy, G. Liot, L. Mery, C. Laurent, X. Sastre-Garau, S. Piperno-Neumann, N. Cassoux, N. Planque, and S. Saule, "Protein Tyrosine Phosphatase 4A3 (PTP4A3) Promotes Human Uveal Melanoma Aggressiveness Through Membrane Accumulation of Matrix Metalloproteinase

- 14 (MMP14),” *Investig. Ophthalmology Vis. Sci.*, vol. 57, no. 4, p. 1982, 2016.
- [551] J. H. Yoo, D. S. Shi, A. H. Grossmann, L. K. Sorensen, Z. Tong, T. M. Mleynek, A. Rogers, W. Zhu, J. R. Richards, J. M. Winter, J. Zhu, C. Dunn, A. Bajji, M. Shenderovich, A. L. Mueller, S. E. Woodman, J. W. Harbour, K. R. Thomas, S. J. Odelberg, K. Ostanin, and D. Y. Li, “ARF6 Is an Actionable Node that Orchestrates Oncogenic GNAQ Signaling in Uveal Melanoma,” *Cancer Cell*, vol. 29, no. 6, pp. 889–904, 2016.
- [552] V. Marchesin, A. Castro-Castro, C. Lodillinsky, A. Castagnino, J. Cyrta, H. Bonsang-Kitzis, L. Fuhrmann, M. Irondelle, E. Infante, G. Montagnac, F. Reyat, A. Vincent-Salomon, and P. Chavrier, “ARF6–JIP3/4 regulate endosomal tubules for MT1-MMP exocytosis in cancer invasion,” *J. Cell Biol.*, vol. 211, no. 2, pp. 339–358, 2015.
- [553] A. Mazouzi, A. Stukalov, A. C. M€, J. Colinge, K. L. Bennett, and J. I. Loizou Correspondence, “A Comprehensive Analysis of the Dynamic Response to Aphidicolin-Mediated Replication Stress Uncovers Targets for ATM and ATMIN,” 2016, *Cell Rep.*, vol. 15, no. 4, pp. 893-908, 2016.

Titre : Rôle de la phosphatase PRL-3 et de CRMP2 dans la migration et l'invasion du mélanome uvéal

Mots clés : mélanome uvéal, PRL-3, CRMP2, migration, invasion, métastases

Résumé : Le mélanome uvéal (MU) est une tumeur rare, affectant 500 à 600 nouveaux cas par an en France, mais il s'agit de la tumeur intraoculaire la plus fréquente chez l'adulte. Cette tumeur est due à la transformation des mélanocytes dérivés de la crête neurale et localisés dans l'uvée (choroïde, corps ciliaire et iris). C'est une tumeur très agressive puisque, malgré le traitement de la tumeur primaire, jusqu'à 50% des patients développeront des métastases hépatiques. En effet, malgré les nombreux efforts fournis pour le développement de nouvelles thérapies, celles-ci se sont révélées jusqu'à présent peu efficaces. Ainsi, une meilleure compréhension du processus métastatique et l'identification des gènes impliqués dans celui-ci sont des enjeux importants pour permettre le développement de nouvelles thérapies. Une analyse transcriptomique réalisée dans le laboratoire a permis d'identifier la phosphatase PRL-3 dont la surexpression est en corrélation avec le développement métastatique et le mauvais pronostic de survie des patients. Des études fonctionnelles ont montré que les cellules de MU exprimant PRL-3 avaient une capacité de migration et d'invasion accrue par rapport aux cellules exprimant une forme mutante catalytiquement inactive de la phosphatase. L'implication de PRL-3 dans le développement tumoral et le processus métastatique a été très largement décrite dans de nombreux cancers et son mécanisme d'action et ses cibles sont en cours d'investigation. De façon intéressante, certaines cibles de PRL-3 sont des protéines liées au cytosquelette. Dans le but d'identifier de nouvelles cibles de PRL-3 dans le MU, nous avons réalisé une analyse phosphoprotéomique qui nous a permis de mettre en évidence la protéine CRMP2. CRMP2 est une protéine liée au cytosquelette dont le rôle a majoritairement été décrit dans le système nerveux. CRMP2 joue un rôle dans le guidage axonal, l'extension des neurites, la dynamique des microtubules et le trafic vésiculaire. Au cours de ma thèse, j'ai pu confirmer que dans les cellules de MU, PRL-3 modifie l'état de phosphorylation de CRMP2 en particulier sur les résidus T514 et S522. De plus, CRMP2 et PRL-3 interagissent et cette interaction aboutit à une diminution de la phosphorylation de CRMP2 sur le T514, ce qui suggère que CRMP2 est une cible directe de PRL-3. Des études fonctionnelles ont montré que l'extinction de CRMP2 par ARN interférent augmente la vitesse de migration et l'invasion des cellules de MU qui expriment PRL-3. CRMP2 est donc un frein à la migration et l'invasion des cellules de MU. La migration et l'invasion accrue dans ces cellules sont corrélées à un réarrangement du réseau d'actine avec une diminution des fibres de stress. L'étude des propriétés micro-rhéologiques des cellules de MU montre également que l'expression de PRL-3 et/ou l'extinction de CRMP2 augmente la viscosité, l'élasticité et la dureté du cytoplasme. L'extinction de CRMP2 ne modifie pas ces propriétés dans les cellules exprimant déjà PRL-3 ce qui montre que l'effet de l'extinction de CRMP2 est équivalent à celui de déphosphorylation. Enfin, dans les tumeurs l'expression de CRMP2 est associée à un bon pronostic de survie. Au cours de ma thèse, j'ai également participé à la création d'une carte du réseau d'interaction des molécules et des voies de signalisation impliquant PRL-3 dans le développement du cancer dans le cadre du projet NaviCell. Cette carte a été intégrée à la base de données ACSN.

Title : Role of the phosphatase PRL-3 and CRMP2 in the migration and invasion of uveal melanoma

Keywords : Uveal melanoma, PRL-3, CRMP2, migration, invasion, metastasis

Abstract : Uveal melanoma (UM) is a rare tumor (500 to 600 new cases by year in France) but this is the most common intraocular cancer in adult. This tumor is due to melanocytes transformation derived from neural crest and localized in uvea (choroid, ciliary body and iris). Despite the primary tumor treatment, up to 50% of patients will develop metastases mostly localized in liver within the years following diagnosis. The median survival rate of metastasis formation is only six months. Indeed, there are currently no effective treatments against metastasis. Therefore, a better comprehension of UM metastatic process and identification of the genes involved are major issues for the development of new therapies. A transcriptomic analysis done in our laboratory allows to identify the phosphatase PRL-3 whose overexpression is correlated with metastatic development and patients poor prognosis. Besides being a bad prognosis marker, functional studies showed that UM cells expressing PRL-3 migrate faster and are more invasive than cells expressing the catalytic dead mutant of the phosphatase. The role of PRL-3 in tumorigenesis and metastatic development is well described, and numerous studies investigate his mechanism of action and his intracellular substrates. Interestingly, some of the identified PRL-3's targets are cytoskeletal proteins. In order to identify new PRL-3's targets in UM, we realized a phosphoproteomic analysis that allows us to identify CRMP2. CRMP2 is a cytoskeletal protein that has been mostly described in the nervous system. CRMP2 plays a role in axonal guidance, neuritis extension, microtubules dynamics and vesicular trafficking. During my PhD, I confirmed that in UM cells, PRL-3 expression modify the phosphorylation state of CRMP2 in particular on T514 and S522 residues. Moreover, CRMP2 and PRL-3 interact together and CRMP2 is less phosphorylated on the T514 following the interaction, which suggests that CRMP2 is a target of PRL-3. Furthermore, we showed that CRMP2 KO by shRNA increases UM cells velocity and invasion in cells expressing PRL-3. So CRMP2 is a brake to the migration and invasion process in UM cells. These observations are correlated with a reorganization of actin cytoskeleton with a reduction of stress fibers. The study of the micro-rheological properties of UM cells showed that PRL-3 expression and/or CRMP2 KO increases the viscosity, elasticity and stiffness of the cytoplasm. CRMP2 KO changes these properties only when PRL-3 is not functional which suggests that concerning the micro-rheology, CRMP2 KO is equivalent the its dephosphorylation by PRL-3. Finally, in UM tumors, CRMP2 expression are correlated with good survival prognosis. My PhD also gave me the opportunity to participate to the creation of a map about interactions and signaling pathways involving PRL-3 in cancers as part of the NaviCell project. This map was integrated in ASCN database.

