



HAL
open science

Rôle de la phosphatase PRL-3/PTP4A3 dans le processus métastatique du mélanome uvéal

Malika Foy

► **To cite this version:**

Malika Foy. Rôle de la phosphatase PRL-3/PTP4A3 dans le processus métastatique du mélanome uvéal. Biologie cellulaire. Université Paris Saclay (COmUE), 2017. Français. NNT : 2017SACLS243 . tel-02955511

HAL Id: tel-02955511

<https://theses.hal.science/tel-02955511>

Submitted on 2 Oct 2020

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.

NNT : 2017SACLS243

THESE DE DOCTORAT
DE L'UNIVERSITE PARIS-SACLAY
PREPAREE A L'UNIVERSITE PARIS- SUD

ÉCOLE DOCTORALE N°577
Structure et Dynamique des Systèmes Vivants
Spécialité de doctorat : sciences de la vie et de la santé

Par

Malika Foy

RÔLE DE LA PHOSPHATASE PRL-3/PTP4A3 DANS LE PROCESSUS
MÉTASTATIQUE DU MÉLANOME UVÉAL

Thèse présentée et soutenue à l'Institut Curie (Orsay), le 19 Septembre 2017 :

Devant le jury composé de :

Président du jury :	Oliver Nüsse	Professeur, UPSUD
Rapporteurs :	Frédéric Mouriaux	PU-PH, CHU de Rennes
	René Marc Mège	DR CNRS, Institut Jacques Monod
Examineur :	Gilles Freiss	CR INSERM, IRCM
Directeur de thèse :	Simon Saule	Professeur, UPSUD
Encadrante :	Nathalie Planque	Maitre de Conférences, UPSUD

Titre : Rôle de la phosphatase PRL-3/ PTP4A3 dans le processus métastatique du mélanome uvéal

Mots clés : mélanome oculaire, PRL-3/PTP4A3, métastases, adhérence et migration cellulaire, intégrines

Résumé : Le mélanome uvéal (MU) est une tumeur maligne intraoculaire rare qui touche environ 500 français par an. Malgré un traitement efficace de la tumeur primaire, la moitié des patients développent des métastases principalement hépatiques dans les années qui suivent le diagnostic. En dépit des nombreux efforts réalisés, les thérapies systémiques adjuvantes restent peu efficaces sur le MU métastatique. L'identification de gènes pronostiques et/ou causals du développement métastatique pourrait ainsi permettre des avancées considérables dans la compréhension de cette pathologie et le développement de nouvelles thérapies. Notre laboratoire a identifié la surexpression du gène codant la protéine tyrosine phosphatase PRL-3/PTP4A3 comme hautement prédictive du risque métastatique et du devenir des patients atteints de MU. Sa surexpression est également décrite dans de nombreux autres types de cancers humains métastatiques. La surexpression de PRL-3 dans des cellules de MU augmente significativement la migration cellulaire *in vitro* et l'invasion *in vivo* de manière dépendant de son activité catalytique, ce qui suggère un rôle direct de PRL-3 dans le processus métastatique du MU. De plus, nous avons montré qu'empêcher l'ancrage membranaire de PRL-3 en utilisant un inhibiteur de farnésylation (FTI-277) abolit la migration induite par PRL-3 dans les cellules de MU, ce qui révèle l'importance de son ancrage membranaire pour la migration cellulaire. Le but de ma thèse a été d'identifier et de caractériser des substrats cellulaires, et plus particulièrement membranaires, de PRL-3 qui seraient impliqués dans le processus métastatique du MU. Mes résultats montrent que la surexpression de PRL-3 dans des cellules de MU, empêchent l'adhérence des cellules

au collagène I et la maturation de structures d'adhérence (FAs) en anneaux impliquant l'intégrine $\beta 1$ (Itg $\beta 1$), de manière dépendante de son activité catalytique et de son ancrage membranaire. Nous avons également montré que PRL-3 interagit avec l'Itg $\beta 1$ et la déphosphorylation sur son motif de phosphorylation intracytoplasmique riche en S/T (T788 et T789), dont l'état de phosphorylation est connu pour réguler l'adhérence cellulaire. Ainsi, mes travaux de recherche ont permis d'identifier PRL-3 comme régulateur des structures d'adhérence à la matrice extracellulaire (MEC) au travers de la régulation de l'Itg $\beta 1$ et potentiellement de la kinase FAK. De plus, dans les FAs nous avons observé que PRL-3 régule spécifiquement l'agrégation de l'Itg $\beta 1$ mais pas celle de l'Itg $\beta 3$, ainsi nous émettons l'hypothèse que cette régulation par PRL-3 serait différentielle entre les intégrines et dépendante de la MEC. Dans le MU, la migration accrue des cellules par PRL-3 peut également être expliquée par une accumulation de la métalloprotéase MT1-MMP/MMP14 à la surface des cellules. Cette protéine transmembranaire est responsable de la dégradation de différents substrats de la MEC et peut-être trouvée dans les FAs. Un travail auquel j'ai contribué, a montré que PRL-3 favoriserait l'accumulation de MMP14 à la membrane plasmique par l'accélération de son trafic vésiculaire. Enfin durant la dernière année de ma thèse, nous avons entrepris de tester les effets de la pentamidine, un antiparasitaire aux propriétés anti-cancéreuses, sur l'inhibition de l'activité de PRL-3. *In vivo*, la pentamidine induirait une inhibition moyenne de la croissance tumorale dans un modèle de xénogreffes murins de MU et de métastases. Les essais *in vitro* sont encore en cours.

Title : Role of the PRL-3/ PTP4A3 phosphatase in the metastatic process of uveal melanoma

Keywords : ocular melanoma, PRL-3/PTP4A3,metastasis, adhesion and cell migration, integrins

Abstract: Uveal Melanoma (UM) is a rare tumor that affects around 500 French people each year. Despite a successful treatment of the primary tumor, 50% of patients develop metastasis primarily to the liver in the years following diagnosis. Currently, systemic adjuvant therapy has been unsuccessful for effective treatment. As such, identifying genes involved in both prognosis and metastasis is important for a better understanding of this disease and in turn for designing better treatment strategies. Our group previously identified that overexpression of the gene encoding PRL-3/PTP4A3, a protein tyrosine phosphatase, is highly correlated with metastatic tumor progression and predicts poor prognosis in patients with UM. It is also known that PRL3 is implicated in the metastatic process of various cancers. Overexpression of PRL-3, but not the inactive mutant of PRL3 (C104S), in an ocular melanoma cell line significantly increased cell migration *in vitro* and invasion *in vivo*, suggesting a direct role of PRL3 in the metastatic process in UM. We also showed that FTI-277, a farnesyltransferase inhibitor that prevents PRL-3 anchorage to the plasma membrane, abolishes PRL-3-induced UM cell migration on collagen I, suggesting that PRL-3 anchorage is important for cell migration. The aim of my thesis was to identify intracellular, and in particular, membrane substrates that could play a role in UM metastasis. My results show that PRL3 overexpression in UM cells prevents both the spreading of cells to the extracellular matrix (ECM),

and the formation of large focal adhesions structures (FA) involving integrin $\beta 1$ (Itg $\beta 1$). These biological effects are PRL-3-activity and anchorage dependent. We show that PRL-3 interacts with and dephosphorylates Itg $\beta 1$ on cytoplasmic threonine 788 and 789, residues that are known to be involved in cell adhesion. Our results identify PRL-3 as a new regulator of cell adhesion structures to the ECM via the regulation of Itg $\beta 1$ and most likely the focal adhesion kinase (FAK). In FA, we observed that PRL-3 specifically regulates the aggregation of Itg $\beta 1$ but does not affect integrin $\beta 3$, so we suppose that this regulation could be specific to certain integrins. In UM cells, the PRL-3-induced cell migration could also be explained by membrane accumulation of the metalloprotease MT1-MMP/MMP14 in the presence of PRL3. This transmembrane proteinase is responsible for ECM degradation and can be found in FA. Moreover, we demonstrated that the vesicular trafficking of MT1-MMP is accelerated in the presence of active PRL-3 but not in presence of the inactive mutant of PRL-3 (C104S). During the last year of my thesis, another aspect of my PhD project was to study the biological effect of pentamidine, an antiparasitic which is known to inhibit the phosphatase activity of PRLs *in vitro*. *In vivo*, we show that pentamidine treatment induces a decrease of tumor growth in a UM patient-derived xerograph model. Overall, the results of my thesis suggest that PRL-3 plays an important role in UM metastasis.

*A mes parents, pour leur soutien et leur amour,
Et à ceux qui, d'ici ou là-bas, me rendent plus forte chaque jour,*

REMERCIEMENTS

C'est avec une grande émotion que je termine l'écriture de ce manuscrit par quelques mots afin de remercier toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à l'aboutissement de ce projet

Je tiens en tout premier lieu à remercier l'ensemble des membres de mon jury de thèse en commençant par mes rapporteurs, le Pr Frédéric Mouriaux et le Dr René Marc Mège pour le temps consacré à lire et examiner mon manuscrit. Je remercie également le Dr Gilles Freiss et le Pr Oliver Nüsse pour avoir accepté de faire partie de mon jury ainsi que pour le temps passé à juger mes travaux.

Je souhaite remercier mon directeur de thèse, le Pr Simon Saule de m'avoir donné l'opportunité d'intégrer son laboratoire. Malgré votre planning, très chargé, vous avez toujours été présent et à l'écoute lorsqu'il le fallait. Je vous remercie pour vos interventions bénéfiques et vos conseils scientifiques.

Mes sincères remerciements vont ensuite à Nathalie Planque qui a supervisé ce projet et m'a encadrée dès mes début à l'Institut Curie. Je te remercie infiniment de m'avoir initiée au métier de chercheur et conseillée tout au long de cette aventure. Cela a été un vrai plaisir de travailler à tes côtés pour faire évoluer le projet « intégrine » et je te suis reconnaissante de m'avoir appris à faire face aux différents aléas de la thèse. Je te remercie également pour ton expertise scientifique, ta disponibilité, tes conseils avisés et toutes les discussions passionnantes, d'ordre scientifiques ou non, que nous avons partagées. Ta passion n'est pas en rien dans l'aboutissement de ce projet et la réussite ma thèse.

Je souhaite également remercier, les membres de plateformes de l'Institut Curie qui ont participé à ce projet. Je remercie ainsi, Marie-Noëlle Soler de la plateforme PICT-IBISA, Sophie Dodier de la plateforme d'histologie, Frédéric Pouzoulet et Christophe Roulin du RadexP, Fariba Némati de la plateforme d'investigation préclinique (LIP) mais également Charlène Lasgi avec qui j'ai partagé de nombreuses heures agréables au FACS.

Mes remerciements chaleureux vont aux membres passés et présents de notre petite équipe :

Selma, je te remercie pour ta gentillesse et pour les encouragements que tu continues à me transmettre même à des milliers de kilomètres du laboratoire. Tu es une vraie source de motivation. Géraldine, merci pour ta sympathie et ta gentillesse. Laurence, ta gentillesse et ta générosité sont inégalables. Je te remercie pour cela mais également pour ton sens de l'écoute et tes précieux conseils qui nous ont ainsi permis d'avoir des conversations tardives et très intéressantes. Mon estomac te remercie également pour les chouquettes du matin! Je suis heureuse d'avoir eu l'occasion de travailler avec vous.

Laura, la « petite dernière du laboratoire » et mon ancienne voisine de bureau. Merci pour ton humour et les bons moments passés ensemble. Grâce à ta merveilleuse recette tu as réussi à me réconcilier avec le tiramisu! Courage tu touches au but !

Je tiens également à remercier Frédéric Coquelle, qui, avant de rejoindre l'équipe, a endossé le rôle de tuteur de thèse. Tu as ainsi pu suivre l'évolution du projet dès ses débuts. Je te remercie pour ton expertise et tes conseils.

Océane, que dire, trop de choses à dire et trop de choses pour lesquelles je dois te remercier. Je crois qu'il me faudrait une dizaine de pages supplémentaires pour que je puisse exprimer toute ma reconnaissance. Merci pour TOUT et TOUT. D'abord je tiens à te remercier pour ton aide et ton expertise en matière de biochimie et de microscopie. Je te remercie pour ta gentillesse et ton soutien, qui, pour la petite histoire, a commencé le jour des auditions au concours de l'école doctorale. Je te remercie pour tes précieux conseils sur les plans personnels et professionnels. Pour faire simple et synthétique, je te remercie d'avoir été présente tout au long de ces années. Grâce à toi, les moments passés au laboratoire n'ont été que plus beaux!

Je tiens également à remercier U1021 l'ensemble des personnes de l'unité U1021/UMR3347. Il sera difficile de citer toutes les personnes sans prendre le risque d'en oublier mais sachez que je vous remercie toutes et tous. Acolytes du club popote, je vous remercie pour les bons moments partagés, les fous rires, les mets que j'ai pu découvrir grâce à vous, les repas de Noël et les gâteaux.

Puisque ma thèse est également une histoire d'amitié qui s'est répandue au-delà des murs de l'Institut, je souhaite remercier toutes celles avec qui j'ai pu passer de merveilleuses soirées « Filles ». Julie, Morgane, Céline, Charlène, Madeleine, Juliette, Roselyne, Leslie, Ha-yeon, Méghane, Ana et Elena. Que ce soit avec les unes ou avec les autres, j'ai passé de très bons moments.

Je souhaite apporter une mention particulière à Ana et Elena. Deux amies, deux personnes merveilleuses que j'ai eu la chance de rencontrer durant ma thèse. On a partagé, on partage et on continuera à partager de merveilleux moments ensemble.

Enfin, mes derniers mots de remerciement vont aux personnes chères à mon cœur. Mille mercis vous sont destinés pour vous témoigner ma gratitude. Merci à mon frère et ma sœur pour leur amour et leur présence. A votre manière vous avez su me rendre plus forte chaque jour. Johann, mon compagnon de tous les jours, je te remercie profondément de partager ma vie. Tu as su comprendre mes doutes et gérer avec mes hauts et mes bas durant ces quatre années. Ton soutien et ta confiance en moi sont indescriptibles, tellement ils sont forts. Si j'en suis ici aujourd'hui c'est aussi grâce à toi. Maman, Papa : Il n'y a pas de mots suffisamment forts qui puissent me permettre d'exprimer l'ampleur de mes remerciements. Entre-autres merci pour ce que vous faites pour nous, merci pour votre amour inconditionnel, votre confiance en moi. Même provenant, de l'autre côté de l'océan Atlantique, votre soutien a été plus qu'important et source d'équilibre. Enfin, je termine mon parcours d'étudiante (du moins je l'espère) et c'est donc avec une grande fierté que je vous dédie cette thèse.

TABLE DES MATIERES

LISTE DES ABREVIATIONS	13
LISTE DES FIGURES	15
LISTE DES TABLEAUX	16
PREAMBULE	19

INTRODUCTION

PARTIE I : L'Œil, Siège du Développement du Mélanome Uvéal	23
---	-----------

1. L'Œil et la choroïde	23
1.1. Anatomie du Globe Oculaire	23
1.2. La Choroïde.....	25
1.2.1. Description anatomique de la choroïde	25
1.2.2. Fonctions de la choroïde	26
1.3. Les Mélanocytes Uvéaux	27
1.3.1. Généralités sur les mélanocytes.....	27
1.3.2. Origine et développement embryonnaire des mélanocytes uvéaux	28
1.3.3. Morphologie des mélanocytes uvéaux	30
1.3.4. Pathologies associées aux mélanocytes choroïdiens	30
2. Le Mélanome Uvéal	32
2.1. Généralités	32
2.1.1. Epidémiologie	32
2.1.2. Predisposition et facteurs de risque.....	33
2.1.3. Symptômes et diagnostic	33
2.1.4. Facteurs pronostiques	35
2.1.5. Traitements de la tumeur primaire	35
2.1.6. Evolution métastatique	36
2.2. Anomalies chromosomiques	37
2.3. Classification des tumeurs selon leur profil d'expression génique	40
2.4. Aspects génétiques du mélanome uvéal: mutations, surexpressions et mécanismes dérégulés	42
2.4.1. Mutations initiatrices du mélanome uvéal : GNAQ/ GNA11 et PLCB4, CYSLTR2 et implication dans les voies MAPK et PI3K/AKT	42

2.4.2.	Mutations corrélées et inversement corrélées à la progression métastatique du mélanome uvéal : BAP1, SF3B1 et EIF1AX	49
2.4.3.	Surexpression de gènes corrélée avec la progression du mélanome uvéal : CCDN1-NBS1 - Synténine - DDEF1 - PRL-3.....	53
2.4.4.	Altérations d'expression de récepteurs et tropisme hépatique des métastases du mélanome uvéal.....	55
2.5.	Développement de thérapies systémiques conventionnelles et ciblées pour le mélanome uvéal métastatique.....	57
PARTIE II : PRLs, PRL-3/PTP4A3 et cancers		61
1.	La famille des PRLs : membre des protéines tyrosine phosphatases.....	61
1.1.	Structure, fonction et localisation subcellulaire des PRLs.....	62
1.1.1.	Caractéristiques communes aux membres des PRLs	62
1.1.2.	Structure tridimensionnelle des PRLs et apport pour la compréhension de leur activité catalytique	63
1.1.3.	Localisation subcellulaire des PRLs et implication de la prénylation	65
1.2.	Expression normale et pathologique des PRLs.....	68
1.2.1.	Expression dans les tissus normaux	68
1.2.2.	Rôle physiologique	69
1.2.3.	Expression des PRLs dans les cancers.....	70
2.	PRL-3 et implication dans les cancers.....	71
2.1.	Expression de PRL-3 dans les cancers	71
2.1.1.	Surexpression de PRL-3 dans les cancers : une protéine aux actions pleïotropes....	71
2.2.	Voies de signalisation modulées par PRL-3.....	74
2.2.1.	Partenaires d'interaction et substrats directs de la phosphatase PRL-3 : Focus sur des protéines de la migration et de l'adhérence cellulaire.....	74
2.2.2.	Voies de signalisation médiées par PRL-3	75
2.3.	Régulation de la phosphatase PRL-3	80
2.3.1.	Régulation transcriptionnelle	80
2.3.2.	Régulation traductionnelle.....	81
2.3.3.	Régulation et modifications post-traductionnelles.....	81
2.4.	L'inhibition de PRL-3 comme voie thérapeutique ?	82
PARTIE III : Mécanismes Moléculaires de la Migration : implication des intégrines et des structures d'adhérence.....		87
1.	Généralités sur la cascade métastatique.....	87
2.	Les différents modes de migration cellulaire	87
2.1.	La migration collective	89
2.2.	La migration mésenchymateuse et amiboïde	89

3.	<i>Aspects moléculaires de la migration cellulaire individualisée.....</i>	91
3.1.	Modèle de migration mésenchymateuse des cellules individualisées	91
3.1.1.	Formation des protrusions au front de migration	91
3.1.2.	Formation des structures d'adhérence focale	92
3.1.3.	Recrutement des protéases aux points focaux	93
3.1.4.	Contraction cellulaire par l'actomyosine	95
3.1.5.	Détachement et rétraction de l'arrière de la cellule.....	95
4.	<i>Les intégrines dans l'adhérence et la migration cellulaire.....</i>	96
4.1.	Les intégrines.....	96
4.1.1.	Diversité des intégrines	96
4.1.2.	Structure des intégrines	98
4.1.3.	Activation des intégrines.....	99
4.1.4.	Signalisations médiées par les intégrines.....	103
4.2.	L'adhésome, la maturation et le désassemblage des structures d'adhérence à la MEC	105
4.2.1.	L'adhésome	105
4.2.2.	Maturation des structures d'adhérence	105
4.2.3.	Désassemblage des structures d'adhérence	109
5.	<i>Les intégrines et cancers.....</i>	110
5.1.	Expression des Intégrines dans le mélanome uvéal.....	111
5.2.	Les intégrines dans la migration cellulaire	112
5.3.	Les intégrines dans l'invasion et la formation des métastases	113
	<i>PARTIE IV : OBJECTIFS DES TRAVAUX DE RECHERCHE.....</i>	115

RESULTATS

<i>PRESENTATION DES RESULTATS.....</i>	121
---	------------

PARTIE A : LE RÔLE DE LA PHOSPHATASE PRL-3 DANS LA MIGRATION DES CELLULES DE MELANOME UVEAL.....

Article 1 : *PRL-3/PTP4A3 phosphatase regulates integrin β 1 in adhesion structures during migration of human ocular melanoma cells.....*

Article 2 : *Protein Tyrosine Phosphatase 4A3/PTP4A3 promotes human uveal melanoma aggressiveness through membrane accumulation of matrix metalloproteinase 14 (MMP14).....*

PARTIE B : INHIBITION DE PRL-3 PAR LA PENTAMIDINE : UNE PISTE THERAPEUTIQUE ?... ..

Effet de la Pentamidine sur les tumeurs de mélanome uvéal exprimant la phosphatase

<i>DISCUSSION.....</i>	
-------------------------------	--

<i>BIBLIOGRAPHIE.....</i>	125
----------------------------------	------------

<i>Résumé.....</i>	143
---------------------------	------------

LISTE DES ABREVIATIONS

CCN	Cellules de crêtes neurales
CCNC	Cellules de crêtes neurales Céphaliques
CGH	Comparative genomic hybridization
COMS	Collaborative Ocular Melanoma Study
FA	Focal adhesion
FISH	Fluorescent In Situ Hybridization
GEP	Gene Expression Profil
IHC	ImmunoHistoChimie
MEC	Matrice ExtraCellulaire
MLPA	Multiplex Ligation- dependant Probe Amplification
MMP	Matrix Metalloprotease
MU	Mélanome uvéal
NLS	Nuclear localization signal
OCM	Ocular melanoma
OMFP	Ortho-MethylFluoresceine Phosphatate
pNPP	Para-NitroPhenyl Phosphate
PDS	Phosphatases à Double spécificité
PDX	Patient-Derived Xenografts
RPE	Retinal Pigmented Epithelium
TEM	Transition Epithelio-Mesenchymateuse

LISTE DES FIGURES

PARTIE I

FIGURE I.1 : Schéma d'une coupe sagittale de l'œil	p. 23
FIGURE I.2 : Histologie de la choroïde	p. 25
FIGURE I.3 : Formation de la crête neurale durant la neurulation	p. 28
FIGURE I.4 : Nævus de l'iris et mélanome de l'uvéa	p. 34
FIGURE I.5 : Courbes de survie Kaplan-Meier selon les statuts des chromosomes 3, 8 et 6	p. 39
FIGURE I.6 : Profils d'expression des 12 gènes permettant la prédiction métastatique dans le mélanome uvéal	p. 41
FIGURE I.7 : Courbes de survie Kaplan-Meier selon la classe des tumeurs de mélanome uvéal	p. 41
FIGURE I.8 : Vue d'ensemble des gènes drivers mutés dans le mélanome uvéal de la classification selon le profil d'expression des gènes et du statut métastatique	p. 43
FIGURE I.9 : Cascades d'activation des MAP Kinases	p. 44
FIGURE I.10 : Voies de signalisation impliquées dans le mélanome uvéal	p. 47
FIGURE I.11 : Modèle de progression de la tumorigenèse du mélanome uvéal	p. 52
FIGURE I.12: Expression de PRL-3 dans les tumeurs de mélanome uvéal	p.55
FIGURE I.13 : Stratégies thérapeutiques du mélanome uvéal	p. 59

PARTIE II

FIGURE II.14 : Alignements de la séquence protéique des PRL-1, PRL-2, PRL-3	p. 62
FIGURE II.15 : Représentation schématique des phosphatases PRLs	p. 63
FIGURE II.16 : Mécanisme chimique de la réaction de déphosphorylation par une phosphatase à double spécificité	p.64
FIGURE II.17 : Modèle d'un réseau de régulation et de la signalisation en aval de la phosphatase PRL-3	p. 79
FIGURE II.18 : Structures chimiques de divers inhibiteurs de la phosphatase PRL-3	p. 84

PARTIE III

FIGURE III.19 : Etapes de la cascade métastatique	p. 88
FIGURE III.20 : Les différents modes de migration cellulaire	p. 90
FIGURE III.21 : Modèle de migration cellulaire en 3D selon un schéma en cinq étapes	p. 92
FIGURE III.22: Classification des différents hétérodimères d'intégrines et leurs ligands	p. 97
FIGURE III.23 : Structure des différents domaines de l'intégrine α IIb β 3	p. 99
FIGURE III.24 : Séquence des queues cytoplasmiques des sous-unités β 1A, β 1D, β 2, β 3, β 5, β 6 et β 7	p. 100
FIGURE III.25 : Activation des intégrines	p.101

FIGURE III.26 : Voies de signalisation en aval des intégrines	p.104
FIGURE III.27: Diversité des structures d'adhérence impliquant les intégrines	p. 107
FIGURE III.28 : Maturation des structures d'adhérence focales impliquant les intégrines	p. 108
FIGURE III.29 : Rôle des kinases FAK et Src dans la migration et l'invasion induite par les intégrines	p. 113

PARTIE IV

FIGURE IV.30: Implication de PRL-3 dans la migration et l'invasion des cellules de mélanome uvéal	p.115
---	-------

RESULTATS

FIGURE R1 : Expression de PRL-3 dans les PDXs de mélanome uvéal	p. 164
FIGURE R2 : Evaluation de l'efficacité anti-tumorale de la pentamidine sur la croissance des PDX MP55 et MM52.	P. 165
FIGURE R3 : Effet dose de la pentamidine sur l'activité phosphatase de PRL-3 recombinante in vitro	p.166
FIGURE R4 : Effet de l'irradiation sur la survie des cellules de mélanome uvéal OCM1	p. 167
FIGURE R5 : Accumulation de foci γ H2AX dans les cellules OCM1-PTP4A3 non irradiées.	p. 167

LISTE DES TABLEAUX

PARTIE I

TABLEAU I.1 : Types cellulaires et tissus dérivés des cellules de la crête neurale	p. 29
TABLEAU I.2 : Gènes drivers ou drivers potentiels mutés du mélanome uvéal	p. 49-50

PARTIE II

TABLEAU II.3 : Expression de PRL-3 dans les tumeurs primaires et métastases dans les cancers humains	p. 73-74
TABLEAU II.4 : Partenaires et substrats identifiés de la phosphatase PRL-3	p. 76

RESULTATS

TABLEAU R5: Caractéristiques génétiques et génomiques des xéno greffes MP55 et MM52 dérivées de tumeurs de patients de mélanome uvéal.	p. 164
--	--------

PREAMBULE

« Cancer » est un terme général appliqué à un grand groupe de maladies qui peuvent toucher n'importe quelle partie de l'organisme. L'une de ces caractéristiques est la prolifération rapide de cellules anormales qui peuvent essaimer dans d'autres organes, formant ce qu'on appelle des métastases (défi ONU). Cette particularité à métastaser est la cause la plus fréquente du décès des patients atteints de cancers. Dans le contexte du mélanome de l'uvée (l'uvée est une tunique de l'œil) 50% des tumeurs primaires forment des métastases hépatiques généralement responsables de la mort des patients.

Les nombreuses investigations réalisées sur les tumeurs de cette pathologie ont permis d'élucider les altérations moléculaires impliquées dans l'initiation de la tumeur et la progression métastatique.

L'une de ces altérations est la surexpression de la protéine PRL-3/PTP4A3 qui a été caractérisée par notre laboratoire. L'expression de cette phosphatase qui appartient à la famille des PTPs est anormalement élevée dans de nombreux cancers métastatiques et ses rôles sont multiples. Notre équipe s'intéresse à son rôle dans le processus métastatique du mélanome uvéal. Nous travaillons plus particulièrement à comprendre les mécanismes d'action par lesquels elle favorise la migration et l'invasion des cellules tumorales.

Ainsi j'ai choisi d'orienter l'introduction de ce manuscrit de thèse selon un fil conducteur allant de la présentation du mélanome uvéal au mécanisme de migration cellulaire. Après une présentation rapide des composants de l'œil et de la structure de la choroïde, un des éléments anatomiques de l'uvée, sera présenté le mélanome uvéal dans la partie I. J'y détaillerai les généralités et les anomalies moléculaires récurrentes qui sont impliquées dans l'initiation et la progression du mélanome uvéal. En raison de l'agressivité de ce cancer et de leur résistance aux traitements conventionnels, le développement de thérapies ciblées devient un vrai challenge et les essais de nouvelles molécules thérapeutiques sont nombreux, bien que peu efficaces. Je présenterai quelques données non exhaustives sur le développement de ces thérapies. La seconde partie est consacrée à la présentation des membres de la famille à laquelle appartient PRL-3, et à PRL-3 elle-même. Depuis la découverte de son expression dans le cancer métastatique du colon en 2001, les études concernant son rôle dans le processus métastatique des cancers sont en pleine expansion. Enfin, parce que la migration cellulaire est un mécanisme dérégulé par PRL-3 dans le mélanome uvéal, la troisième partie y sera consacrée. Des acteurs clés de la migration, souvent exprimés à des taux élevés dans les cancers, y compris dans le mélanome uvéal, y seront présentés. Dans la dernière partie je vous présenterai mes objectifs de thèse en remettant dans le contexte les différents aspects sur lesquels j'ai travaillé, c'est-à-dire le rôle de PRL-3 dans l'invasivité des cellules de mélanome uvéal à travers la régulation de deux acteurs clés, l'intégrine $\beta 1$ et la métalloprotéase MMP14/MT1-MMP qui sont parmi les cibles de PRL-3 étudiées dans le laboratoire.

INTRODUCTION

PARTIE I: L'Œil, Siège du Développement du Mélanome Uvéal

1. L'Œil et la choroïde

1.1. Anatomie du Globe Oculaire

L'œil ou globe oculaire est une sphère imparfaite de 23 à 23,5 mm dédiée à la perception des objets de notre environnement. C'est une structure complexe dont seulement une petite partie est dédiée à la phototransduction. Il s'agit d'un ensemble de processus biochimiques qui permet la conversion des signaux lumineux perçus par l'œil en influx nerveux, en mettant en jeu des composants optiques et neuronaux. Les composants optiques, autrement appelés milieux transparents, sont des structures transparentes qui captent et autorisent le passage des rayons lumineux dans l'œil et les focalisent vers la rétine. De l'élément optique le plus externe vers le plus interne de l'œil on retrouve : l'humeur aqueuse, le cristallin et le corps vitré (Figure I.1) (Dulbecco 1997; Saladin 2014). Les neurones présents dans la couche sensorielle de la rétine, le neuroépithélium, convertissent les rayons lumineux en signaux électriques qui sont transmis au système nerveux central par le nerf optique. Ces deux structures anatomiques –la rétine et le nerf optique- forment le groupe des composants neuronaux (Figure I.1) (Dulbecco 1997; Saladin 2014). L'ensemble de ces composants internes sont protégés des agressions extérieures par des tuniques formant l'enveloppe de l'œil. Ces tuniques, au nombre de trois, comprennent la tunique fibreuse, la tunique vasculaire et la tunique nerveuse.

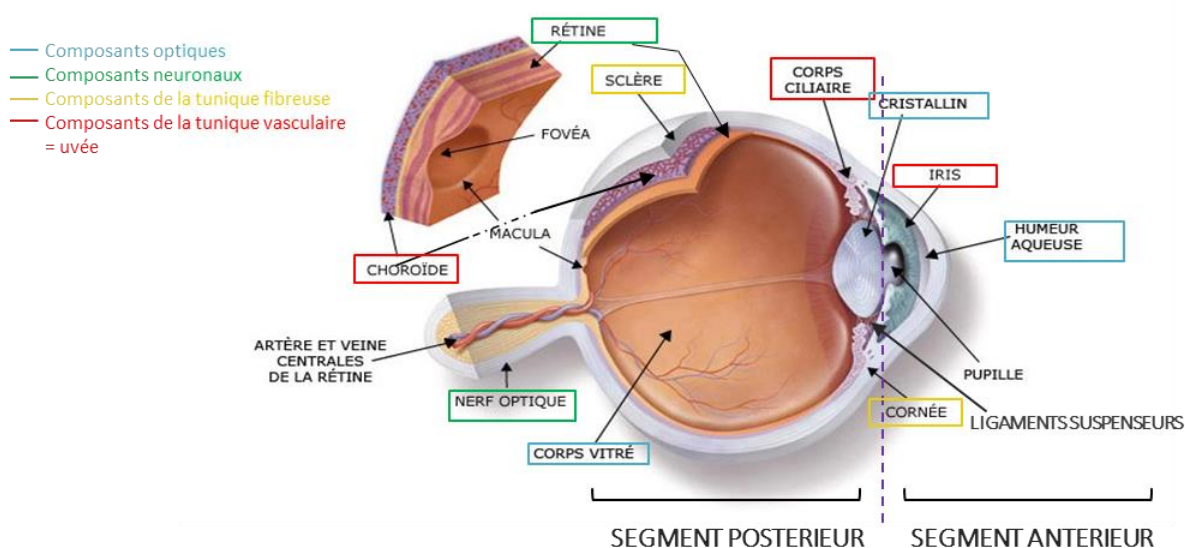


Figure I.1: Schéma d'une coupe sagittale de l'œil. La choroïde, le corps ciliaire et l'iris forment une structure appelée l'uvéa. Le cristallin délimite les deux segments constitués des milieux transparents de l'œil. En avant le segment antérieur comprend la cornée, l'humeur aqueuse et l'iris; En arrière le segment postérieur se constitue du corps vitré. Image adaptée de (<http://dr-leininger.fr/loeil-et-la-vision/anatomie-de-loeil>)

La tunique nerveuse est la couche interne de l'œil et se compose de la rétine.

La tunique fibreuse est la membrane externe de l'œil. Elle est constituée de la sclérotique et de la cornée en avant de l'œil. La sclérotique est un tissu conjonctif dense, peu vascularisé et blanc qui assure l'intégrité des structures internes de l'œil et contribue à maintenir sa forme et son volume. Essentiellement constituée de collagène dense, elle s'étend jusqu'à l'avant de l'œil où elle devient transparente et forme la cornée. Cette partie non vascularisée mais riche en fibres nerveuses réagit aux agressions physiques extérieures (Dulbecco 1997; Saladin 2014) (Figure I.1).

La tunique vasculaire est également appelée **uvée**. Elle est formée de la choroïde, du corps ciliaire et de l'iris. La choroïde recouvre la partie postérieure du globe oculaire, à l'approche de la zone antérieure elle se transforme en corps ciliaire et se termine par l'iris. Comme l'indique son nom (tunique vasculaire), elle se compose de vaisseaux sanguins mais on y retrouve également des nerfs, différents tissus de soutien et des mélanocytes.

La choroïde est une couche cellulaire qui tapisse les 2/3 de la face interne de la sclérotique, elle s'étend du nerf optique jusqu'à la face antérieure de l'œil. Elle est richement vascularisée et pigmentée en brun par la présence des mélanocytes. (voir section 1.2) (Dulbecco 1997; Saladin 2014)(Figure I.1).

Le corps ciliaire est la couche intermédiaire de l'uvée, c'est aussi la plus épaisse. Elle se forme par épaissement de la choroïde dans son prolongement antérieur. Le corps ciliaire se divise en deux parties comprenant : les procès ciliaires qui sont riches en vaisseaux sanguins et qui sécrètent l'humeur aqueuse ; et le muscle ciliaire (lisse) qui modifie la courbure du cristallin pour aider l'accommodation (Dulbecco 1997; Saladin 2014). (Figure I.1)

L'iris est la partie la plus antérieure de l'uvée et se situe entre la cornée et le cristallin. L'iris est inséré à la base du corps ciliaire. C'est une membrane colorée et visible perforée en son centre par un orifice circulaire, la pupille. L'iris se compose de fibres musculaires lisses, radiaires et circulaires qui permettent de contrôler le diamètre de la pupille selon l'accommodation et l'intensité lumineuse. Suite à l'exposition de l'œil à une lumière vive les muscles circulaires se contractent et diminuent le diamètre de la pupille ; en présence d'une faible luminosité se sont les muscles radiaires qui se contractent pour dilater la pupille (Figure I.1) (Dulbecco 1997; Saladin 2014).

La vascularisation de l'œil prend son origine dans l'artère ophthalmique. L'artère centrale de la rétine pénètre le nerf optique en sa face antérieure et vascularise les couches internes de la rétine. A l'exception de cette tunique, l'ensemble des structures de l'œil sont alimentées par un important réseau d'artères et de veines choroïdiennes. Près de 85% du volume sanguin oculaire provient de la choroïde. En revanche, le globe oculaire est dépourvu de drainage lymphatique.

1.2. La Choroïde

1.2.1. Description anatomique de la choroïde

La choroïde est l'un des tissus les plus vascularisés du corps humain. Outre les vaisseaux artériels et veineux, elle se compose de mélanocytes, de fibroblastes, de lymphocytes, de macrophages et de mastocytes. On y trouve ponctuellement des neurones. Ces types cellulaires sont entourés et scellés dans un stroma fibreux essentiellement composé de fibres de collagène et d'élastine.

Chez les êtres humains, cette couche située entre la rétine et la sclérotique, est d'une épaisseur approximative de 200µm à la naissance et s'amincit au cours du temps pouvant atteindre 80µm vers 90 ans (Debra L. Nickla and Josh Wallman 2010). Histologiquement elle se décompose en 5 couches principales: la membrane de Bruch, la couche choriocapillaire, les couches vasculaires (la couche de Haller et la couche de Sattler) et la supra choroïde (Figure I.2).

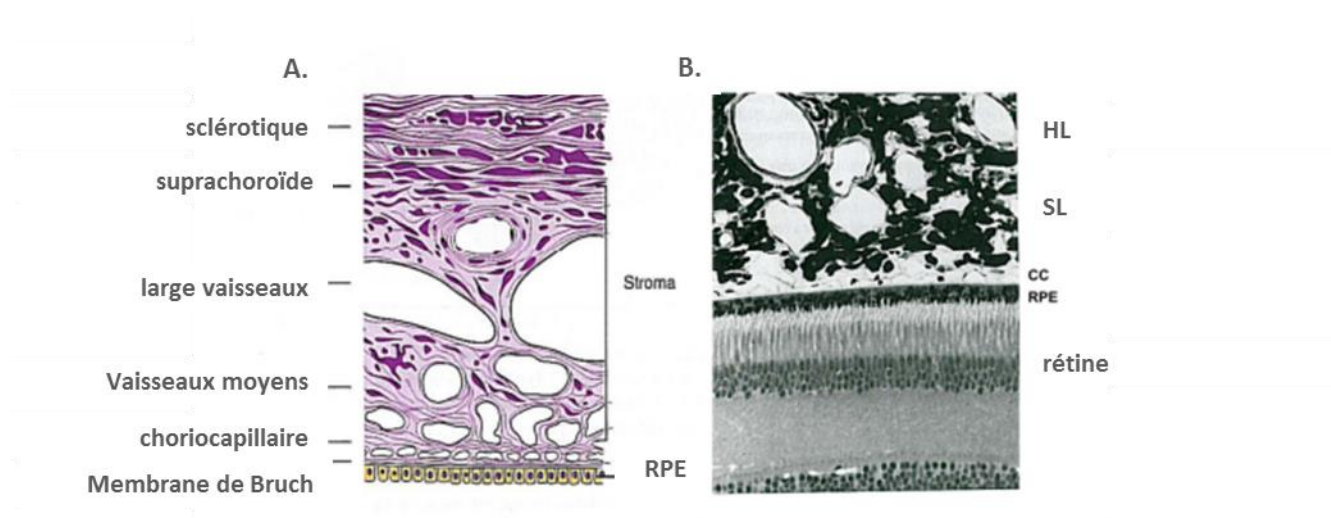


Figure I.2 : Histologie de la choroïde. (a) Schéma des couches de la choroïde. (b) Section de la couche externe de la rétine et de la choroïde d'une œil de primate. RPE : épithélium pigmenté de l'œil; CC: choriocapillaris; SL : couche de Sattler; HL : couche de Haller. Figure et légende adaptées de (Debra L. Nickla and Josh Wallman 2010).

- La supra choroïde est une zone de transition à l'interface de la sclérotique et de la choroïde. Elle connecte ces deux couches par l'intermédiaire des fibres d'élastine et de collagène qui la composent. Cet espace, riche en nerfs, mélanocytes et fibroblastes au repos, est traversé par les artères sanguines qui approvisionnent la choroïde.
- La région vasculaire de la choroïde est une zone particulièrement lâche en tissus collagèneux et élastique. Les mélanocytes et fibroblastes y sont nombreux mais éparses. On y trouve également quelques lymphocytes et macrophages. La majorité du volume est occupé par un important réseau vasculaire distribué sur deux couches en fonction de leur taille. La couche supérieure, qui est dite de Haller accueille les vaisseaux de grands diamètres (artères ciliaires et postérieures) et la couche de Sattler se compose des vaisseaux de moyens et petits diamètres.

- la couche capillaire de la choroïde ou choriocapillaire, est la couche antérieure du stroma choroïdien (tissu vasculaire). Elle forme une monocouche de vaisseaux sanguins aplatis et resserrés qui proviennent de la région vasculaire. Ces capillaires alimentent les couches externes de la rétine, l'épithélium pigmenté de la rétine (RPE) et la zone de la macula, dépourvue de vaisseaux, en leur fournissant éléments nutritifs et oxygène.
- La membrane de Bruch marque la limite interne de la choroïde. Cette membrane acellulaire de la choroïde siège sur la RPE et délimite la choroïde de la rétine. Elle a néanmoins la particularité d'être composée d'éléments provenant de ces deux tuniques. De la couche interne vers la couche externe, elle est formée de : la lame basale de la RPE, une couche interne de fibres de collagène, une couche de fibres élastiques, une couche externe de fibres de collagène, la lame basale de la couche choriocapillaire. Les cellules cancéreuses qui proviennent de la choroïde dégradent et migrent au travers de cette membrane afin d'envahir la rétine et le corps vitré.

1.2.2. Fonctions de la choroïde

La choroïde assume différentes fonctions grâce aux différents types cellulaires qui la composent (Debora L. Nickla and Josh Wallman 2010).

L'importante vascularisation engendre un débit sanguin élevé qui lui confère un important rôle nourricier; près de 800ml de sang sont déversés par minute dans la choroïde ce qui est dix fois supérieur à celui retrouvé dans le cerveau, et quatre fois supérieur à celui du cœur (Debora L. Nickla and Josh Wallman 2010). Ce débit est crucial pour que la choroïde accomplisse ses autres fonctions. Plus précisément, les capillaires choroïdiens apportent les nutriments et l'oxygène nécessaires au bon fonctionnement de la rétine. 90% de l'apport en oxygène est destiné aux photorécepteurs de la rétine qui ont un besoin métabolique important, et décuplé en absence de lumière. Le flux sanguin contribue également au maintien de la pression intraoculaire et la thermorégulation de la rétine. Un défaut d'échanges gazeux et nutritifs entre la choroïde et la RPE pourrait causer une dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA) et la cécité (Debora L. Nickla and Josh Wallman 2010).

En plus de ces rôles vasculaires, la choroïde participe à l'ajustement de la position de la rétine ainsi qu'à la croissance de la sclérotique et par conséquent à la taille de l'œil. Trois hypothèses peuvent expliquer le rôle de la choroïde dans le contrôle de la taille de la sclérotique, et cela comprend : (1) son épaisseur qui altérerait la transmission des signaux moléculaires provenant de la RPE ou de la rétine, (2) la sécrétion de facteurs de croissance qui inhiberait ou favoriserait la croissance de la sclérotique et (3) l'aire de la choroïde qui pourrait mécaniquement influencer l'aire de la sclérotique et la taille du globe oculaire (Debora L. Nickla and Josh Wallman 2010).

1.3. Les Mélanocytes Uvéaux

1.3.1. Généralités sur les mélanocytes

Les mélanocytes sont des cellules pigmentaires dendritiques de l'organisme qui se caractérisent par la production de la mélanine, un pigment à l'origine de la couleur de la peau, des cheveux, des poils et de l'iris. Les mélanocytes sont essentiellement identifiés dans la peau, mais des mélanocytes existent également dans d'autres sites extra-cutanés tels que les yeux, l'oreille interne, la cochlée, le cœur, les méninges et l'appareil digestif. Bien qu'ils aient des fonctions qui varient selon leur localisation dans l'organisme, deux rôles majeurs peuvent être dégagés (Plonka et al. 2009). Le premier attribut des mélanocytes est la pigmentation, citée ci-dessus. Chez l'humain, la mélanogénèse uvéale survient dès la 20^{ème} de vie embryonnaire et, contrairement aux mélanocytes cutanés, s'arrête quelques semaines après la naissance (Boissy & Hornyak 2007). 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. Les mélanocytes ont un rôle protecteur, aussi bien contre les rayonnements UVs au niveau de la peau, que contre les radicaux libres (peau et méninges). A titre d'exemple, les mélanocytes cutanés transfèrent leurs mélanosomes aux kératinocytes avoisinants, ce qui protège la peau des dommages causés par les rayons UVs. Le mélanosome est l'organite cellulaire spécifique des mélanocytes responsable de la synthèse de la mélanine.

Le deuxième aspect des mélanocytes est associé à un rôle sensitif dans la vision (yeux), l'ouïe (cochlée) et l'équilibre (oreille interne) (Yamaguchi & Hearing 2014). Bien que le rôle des mélanocytes non cutanés ne soit pas encore bien compris, leurs fonctions semblent essentielles et leur absence ainsi que la perturbation de leur fonctionnement peut engendrer des anomalies (Yamaguchi & Hearing 2014; Tshori et al. 2006; Smith et al. 2000).

De la transformation et de l'hyperprolifération des mélanocytes naissent les mélanomes. Le mélanome cutané représente 91% des mélanomes. D'autres, moins bien connus et étudiés, se développent au niveau de l'uvéa (mélanome uvéal), des paumes de mains et des plantes de pieds ou des ongles (mélanomes acraux) ainsi qu'au niveau des muqueuses buccales, vaginales et rectale (mélanome muqueux) (Shields et al. 2015).

Brièvement, nous allons aborder l'origine embryonnaire, le développement et la morphologie des mélanocytes uvéaux. Nous aborderons ensuite les pathologies qui sont associées à un dysfonctionnement des mélanocytes oculaires et nous ouvrirons sur la dernière section de cette partie qui sera consacrée au mélanome uvéal.

1.3.2. Origine et développement embryonnaire des mélanocytes uvéaux

Les mélanocytes représentent l'une des deux catégories de cellules pigmentées de l'organisme, l'autre catégorie étant composée des cellules pigmentées de la RPE. Ces deux groupes cellulaires sont d'origine embryonnaire, de localisation anatomique et de morphologies distinctes. A l'inverse des cellules pigmentées de la RPE qui ont pour origine embryonnaire le neuroectoderme, les mélanocytes dérivent de la crête neurale. La crête neurale est une structure embryonnaire transitoire qui naît de la formation du tube neural (Le Douarin & Kalcheim 1999) (Figure I.3)

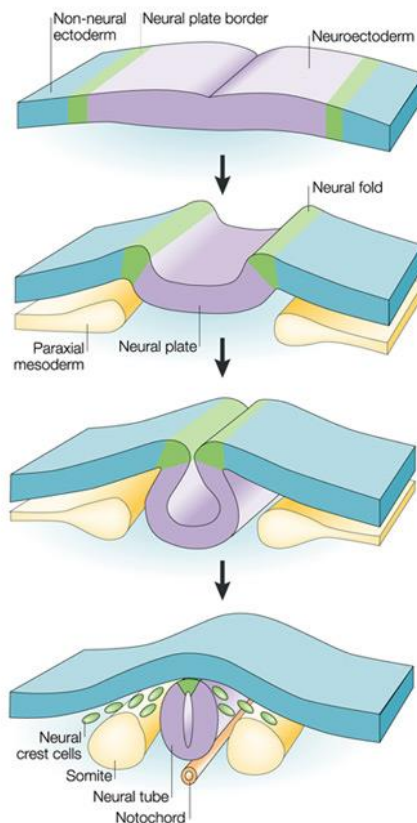


Figure I.3 : Formation de la crête neurale durant la neurulation. La bordure neurale (en vert) est induite grâce aux signaux provenant du neuroectoderme (en violet), de l'ectoderme non neuronal (en bleu), et du mésoderme paraxial sous-jacent (en jaune). Durant la neurulation, les bords de la plaque neurale s'élèvent (bourrelets neurales en vert) et se rejoignent pour former le tube neural. En fonction de l'espèce et de l'axe, les cellules de la crête neurale (en vert) délaminent soit des bourrelets neurales soit de la partie dorsale du tube neural (cas montré). Figure et légende d'après (Gammill & Bronner-Fraser 2003)

La population cellulaire des crêtes neurales se constitue de progéniteurs pluripotents et transitoires capables de se différencier en de nombreux types cellulaires. Les précurseurs des cellules des crêtes neurales (CCN) se trouvent en bordure de l'ectoderme neural, à la frontière de l'ectoderme non-neural (Figure I.3). Lors de la neurulation, les bords de la plaque fusionnent pour former le tube neural (Figure I.3) (Le Douarin & Kalcheim 1999; Gammill & Bronner-Fraser 2003).

Une transition épithelio-mésenchymateuse permet aux CCN de délaminer et de migrer dans l'embryon par vagues successives en suivant des voies spécifiques et conservées chez les vertébrés, donnant ainsi naissance à différents lignages cellulaires (Duband 2006; Duband 2010). 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 (méséctoderme), des neurones et de la glie du système sensoriel périphérique et autonome, des cellules de Shwann du système périphérique et de certaines cellules endocrines (Le Douarin & Kalcheim 1999; Delaney et al. 2014). Les cellules dérivées des crêtes neurales sont référencées le tableau I.1. Les mélanoblastes issus de la crête neurale céphalique migrent de manière spécifique à travers le mésenchyme de l'embryon selon un axe dorso-latéral (Le Douarin & Kalcheim 1999). Après cette phase de migration, les mélanoblastes parviennent aux sites anatomiques d'intérêt, notamment au niveau de la zone oculaire où ils se différencieront en mélanocytes uvéaux (Le Douarin & Kalcheim 1999; Noden et al. 1995). Le développement embryonnaire des mélanocytes uvéaux contribue en association avec les cellules pigmentées de la RPE au bon développement de la rétine et à la qualité de l'acuité visuelle. Il a été montré, dans des formes classiques d'albinisme, qu'une hypopigmentation de l'uvée et de la RPE corrént avec une diminution significative de l'acuité visuelle (Creel et al. 1990; Boissy & Hornyak 2007.). De même, la synthèse de mélanine durant l'embryogénèse est critique pour l'établissement du réseau optique neuronal. (Colello & Jeffery 1991; Boissy & Hornyak 2007).

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	
		Chromafinn cells	

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

Tableau I.1 : Types cellulaires et tissus dérivés des cellules de la crête neurale (CCN). 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, vagales, 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).

1.3.3. Morphologie des mélanocytes uvéaux

Les mélanocytes de l'uvée établissent peu de contact direct avec les autres types cellulaires de l'enveloppe uvéale. Les mélanocytes de la choroïde sont fusiformes, présentent un noyau central et deux à plusieurs dendrites en périphérie. Leur cytoplasme contient des mélanosomes matures et pigmentés. Ces mélanosomes ont une forme ovale à sphérique d'un diamètre moyen de 0,4 µm (0,3 µm à 1 µm) (Boissy & Hornyak 2007).

Ces mélanocytes bi/multi-dendritiques présentent des changements de morphologie quand ils résident dans le corps ciliaire ou l'iris. Au niveau du corps ciliaire, les mélanocytes deviennent adendritiques et sphériques (forme d'une cellule épithéliale); et retrouvent leur forme dendritique quand ils sont aux niveaux des ligaments suspenseurs et dans l'iris. Au niveau de l'iris, les mélanocytes sont dendritiques et orientés quand ils sont localisés derrière la couche de fibroblastes en contact avec la chambre antérieure de l'œil. Dans le reste de la surface de l'iris ils sont non-orientés. La taille des mélanosomes iridiens sont plus petits que ceux retrouvés dans les mélanocytes choroïdiens (0,25-0,75µm) et varient en fonction de la couleur des yeux de l'individu (Boissy & Hornyak 2007).

Les mélanocytes choroïdiens sont nombreux dans le tissu conjonctif, et ils restent immobiles et latents. La faible quantité de mitochondries présentes dans leur cytoplasme témoigne d'une faible activité métabolique et proliférative. La reprise de la prolifération des mélanocytes choroïdiens durant la vie de l'être humain est souvent liée à leur transformation et au développement d'un *nevus* ou de pathologies comme le mélanome uvéal (Shields et al. 2008).

1.3.4. Pathologies associées aux mélanocytes choroïdiens

Les pathologies associées aux mélanocytes choroïdiens surviennent soit d'une anomalie congénitale de la pigmentation soit d'une prolifération anormale conduisant, dans certains cas, à leur transformation en cellules tumorales.

a) Anomalies congénitales de la pigmentation :

L'homogénéité de la pigmentation dépend de la migration des mélanoblastes durant le développement embryonnaire, de la différenciation et du développement des mélanocytes et du bon fonctionnement de la mélanogénèse.

Succinctement, les anomalies référencées qui font suite à un défaut de migration des mélanocytes choroïdiens ou de leurs précurseurs, les mélanoblastes, sont respectivement le syndrome de

Waardenburg et les mélanoses oculaires congénitales. **Le syndrome de Waardenbrug (waardenburg 1951)** se manifeste par des zones dépigmentées de la peau et des cheveux, des problèmes d'audition et au niveau des yeux, par des iris bleus vifs ou atrophiés et par un aspect albinoïde du fond de l'œil à cause d'une déficience du nombre de mélanocytes uvéaux (Mouriaux et al. 1999). **Les mélanoses oculaires congénitales** résultent de la migration anormale des mélanocytes qui s'accumulent anormalement dans la sclérotique et l'uvée. Cette pathologie se traduit par une hyperpigmentation bleutée de la sclérotique. Ces atteintes sont dues à la présence anormalement élevée de mélanocytes normaux et à un débordement hors du territoire normal (Mouriaux et al. 2005). **L'albinisme** est la conséquence d'un trouble de fonctionnement de la synthèse de la mélanine par les mélanocytes qui se présentent en nombre normaux. L'albinisme se manifeste par une hypopigmentation de la peau, des cheveux, des poils et des yeux. Ce défaut de pigmentation est associé à un défaut du réseau optique et une acuité visuelle diminuée. Dans les cas d'albinisme, la vascularisation de la choroïde peut-être facilement observée en raison du manque de mélanine (Mouriaux et al. 2005).

b) Pathologies associées à une hyperprolifération des mélanocytes choroïdiens.

Le naevus choroïdien résulte de la prolifération des mélanocytes de la choroïde et de la modification du tissu choroïdien qui forme une « colonie ». Ces lésions, rares chez l'enfant et plus fréquentes chez l'adulte, se déclinent selon un panel de coloration en fonction des degrés de pigmentation mais, en général, les naevi sont pigmentés. Il s'agit d'une tumeur bénigne retrouvée dans 6,5% des individus (Shields et al. 2015), mais qui, cliniquement, reste proche du mélanome choroïdien, ce qui en fait un problème de diagnostic majeur puisqu'il est nécessaire de détecter le caractère évolutif du *naevus*. Les *naevi* bénins, lorsqu'ils sont petits (<5mm de diamètre), plats et asymptomatiques ne posent pas de problème (Singh et al. 2005 et COMS). Le diagnostic devient plus compliqué quand les naevi sont suspects. Des *naevi* sont considérés comme suspects quand ils ont un diamètre supérieur à 7mm, une épaisseur supérieure à 2mm et deviennent symptomatiques. En cas d'évolution de ces *naevi*, on considère qu'ils peuvent évoluer en mélanome. Le risque de dégénérescence d'un naevus choroïdien en mélanome est faible, mais semble prédisposer au développement du mélanome choroïdien puisque 1 naevus/8845 dégénère par an (Singh et al. 2005). L'enjeu actuel est d'identifier s'il s'agit d'une lésion précancéreuse ou d'un facteur de risque établi du mélanome uvéal.

Le mélanocytome est une tumeur bénigne rare de la papille du nerf optique. Il s'agit d'une tumeur pigmentée, de petite taille et dont la croissance est lente. Histologiquement, il est assimilé à un naevus de bon pronostic dont la transformation maligne est rare (Shields et al 2000). Zimmerman Le et McLean supportent le fait que les mélanocytomes papillaires dérivent de la prolifération anormale des mélanocytes uvéaux dans la part antérieure du nerf optique (lame criblée)(Zimmerman & McLean 1980) (Mouriaux et al. 2005).

Le mélanome uvéal dérive de la prolifération des mélanocytes de la couche uvéale et représente 5% des mélanomes. Bien que rare, il s'agit de la tumeur primaire intraoculaire la plus fréquente chez l'adulte, représentant 85% des mélanomes oculaires. Les mélanomes uvéaux et cutanés, bien qu'ils partagent la même origine embryonnaire sont deux entités cancérogènes différentes. La localisation anatomique des mélanocytes néoplasiques, les altérations chromosomiques, et les mécanismes moléculaires dérégulés y sont notamment différents. La section suivante sera entièrement consacrée à décrire plus en détails le mélanome uvéal.

2. Le Mélanome Uvéal

2.1. Généralités

Le mélanome uvéal est un cancer rare, qui naît de la transformation des mélanocytes issus de la crête neurale et qui sont localisés dans l'uvée. Le caractère asymptomatique du mélanome uvéal rend le diagnostic tardif, et souvent la tumeur a déjà disséminée au moment du diagnostic. Malgré un traitement efficace de la tumeur primaire, par des traitements conservateurs ou non conservateurs, plus de 50% des patients ayant une tumeur primaire avancée, développent des métastases principalement hépatiques, dans les cinq ans suivant le diagnostic initial (Shields et al. 2015). Les causes spécifiques du mélanome uvéal sont encore inconnues. Néanmoins des facteurs pronostics histologiques, chromosomiques et génomiques définis permettent de prédire le caractère invasif de la tumeur et le développement de métastases. Le mélanome uvéal peut être classifié en deux groupes : la classe 1 associée à un faible risque métastatique et la classe 2 associée à un haut risque métastatique. Les recherches intenses réalisées sur ce cancer agressif ont permis de mieux comprendre la biologie du mélanome uvéal, d'identifier les altérations moléculaires et les voies de signalisation dérégulées dans cette pathologie. Malgré les efforts réalisés, le mélanome uvéal métastatique reste résistant aux traitements chimiothérapeutiques ou immunothérapeutiques conventionnels, avec un taux de réponse inférieur à 20%. De nombreuses thérapies adjuvantes sont développées et en cours d'essais cliniques, mais elles sont encore peu efficaces sur la survie globale des patients.

2.1.1. Epidémiologie

90% des mélanomes uvéaux se développent dans la choroïde, 7% dans le corps ciliaire, et 3% des cas sont issus de l'iris (Damato 2006). On recense annuellement ~700 nouveaux cas en France, et 1200 à 1500 nouveaux cas aux Etats-Unis (Vidal et al. 1995; Harbour 2012). L'incidence mondiale annuelle est évaluée entre 2 et 8 nouveaux cas par million d'habitants, une tendance qui reste globalement stable depuis plusieurs années (Vidal et al. 1995; Virgili et al. 2007; Damato & Damato 2012; Shields et al. 2015; Singh et al. 2011). Le mélanome uvéal affecte autant les hommes que les femmes (51% vs 49%), principalement caucasiens. Il survient dans un intervalle d'âge entre 50 et 80 ans, avec un âge médian au moment du diagnostic de 60 ans (Benjamin A Krantz, Nikita Dave, Kimberly M

Komatsubara & Carvajal 2017; Damato & Damato 2012), à l'exception du mélanome iridien qui apparaît plus tôt. Les enfants et les adolescents sont très rarement touchés par ce type de cancer.

2.1.2. Prédisposition et facteurs de risque

L'implication du sexe et l'âge des patients, ainsi que l'exposition aux UVs ne sont pas clairement définis dans la survenue de la tumeur. Une exposition prolongée aux UVs due à une activité professionnelle (soudeurs ou cuisiniers...) est considérée comme un facteur de risque contrairement à une exposition intermittente aux UVs pour les loisirs (bronzage, promenades et jeux d'extérieur) (Shah et al. 2005; Nayman et al. 2017). Ceci pourrait s'expliquer par le fait que les rayons UVs ne pénètrent pas les structures oculaires profondes (Amaro et al. 2017). Indépendamment du lieu de naissance, qui n'est pas un facteur de risque significatif, le prototype clair (peau et yeux clairs) semble être un facteur significatif à la maladie (Nayman et al. 2017; Saornil 2004). Les patients caucasiens provenant d'Europe du nord et des Etats-Unis sont très largement touchés par le mélanome uvéal, contrairement aux hispaniques, asiatiques et noirs américains qui présentent une incidence très faible (Shields et al. 2015). La présence de *neavi* iridiens, choroïdiens ou cutanés atypiques, ou d'une mélanocytose congénitale oculaire sont considérées comme des facteurs prédisposants au mélanome uvéal (Shields et al. 2015; SINGH et al. 2005). La présence de *neavi* cutanés atypiques augmente fortement le risque de développer un mélanome uvéal (Nayman et al. 2017). 1 patient sur 400 (Singh et al. 1998) présentant une mélanocytose congénitale développe un mélanome choroïdien et il y a 1 chance sur 8845 pour qu'un *nævus* choroïdien évolue en mélanome choroïdien (Singh et al. 2005). Malgré cette association pathologique faible, les patients présentant ces affections bénéficient d'un suivi ophtalmologique régulier afin de dépister l'éventuelle apparition d'un mélanome. Les cas familiaux de mélanome uvéal sont extrêmement rares (<1%), mais lorsqu'ils sont reportés, ils sont associés à des mutations dans le gène BAP1 localisé sur le chromosome 3 (voir section 2.2). Ces mutations, retrouvées dans plusieurs membres d'une même famille, prédisposent au développement du mélanome uvéal, du mésothéliome et à d'autres cancers (Harbour et al. 2010; Rai et al. 2016; Rai et al. 2017; Cheung et al. 2013).

2.1.3. Symptômes et diagnostic

Les manifestations cliniques du mélanome uvéal dépendent de la taille et de la localisation intraoculaire de la tumeur selon un axe antéro-postérieur. Les mélanomes de la choroïde et du corps ciliaire sont des mélanomes postérieurs. Ils présentent des caractéristiques différentes du mélanome iridien qui est localisé au pôle antérieur. Néanmoins 40% des mélanomes uvéaux sont asymptomatiques et indolores (Shields et al. 2015; Benjamin A Krantz, Nikita Dave, Kimberly M Komatsubara & Carvajal 2017) et le diagnostic initial est alors souvent posé lors d'un examen ophtalmologique systématique ou motivé par la présence de gênes visuelles.

Le mélanome de l'iris, est suspecté par la présence d'une tache de taille croissante. Il peut causer une distorsion de la pupille, un glaucome secondaire ou de la cataracte. 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 (Shiels et al, 2015) (Figure I.4).

Le mélanome du corps ciliaire est détecté lorsqu'il a atteint une taille suffisamment grande pour provoquer un déplacement du cristallin et un décollement de la rétine. Certains, évoluent dans la choroïde (mélanome ciliochoroïdien) ou dans l'iris et la chambre antérieure de l'œil (mélanome iridociliaire).

Le mélanome de la choroïde, dérivant parfois d'un naevus choroïdien, se présente sous forme de « dôme » ou de « champignon » et plus rarement comme une tache diffuse. La forme en « champignon » est observée lorsque les mélanocytes tumoraux de la choroïde ont dégradé la membrane de Bruch et que la tumeur a évolué dans le corps vitré.

Les manifestations cliniques observées dans ces deux cas peuvent être dues au décollement de la rétine et sont : une vision floue, une baisse de l'acuité visuelle, une obstruction du champ de vision. La pression intraoculaire peut aussi être affectée (Shields et al, 2015).

Les mélanomes de la choroïde et du corps ciliaire présentent souvent des atteintes extrasclérales et extraorbitales. La cataracte et le glaucome secondaire sont des maladies oculaires qui leur sont rarement associées.

Actuellement, les technologies d'examen ophtalmologique et angiographique (fond de l'œil, angiographie à la fluorescéine et au vert d'indocyanine, ultrasonographie etc.) permettent une grande précision du diagnostic avec 99% des diagnostiqués lors de l'examen ophtalmologique (COMS report n°01).

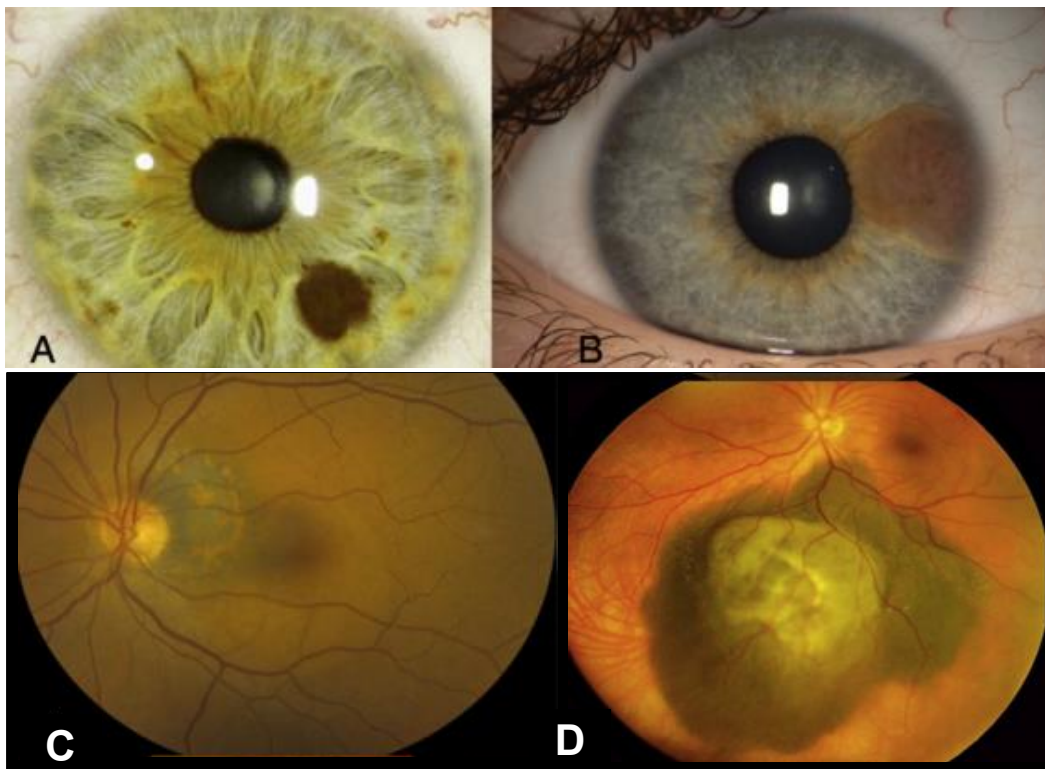


Figure I.4 : Naevus de l'iris et mélanome de l'uvéa. (A) Naevus de l'iris. (B) Petit mélanome de l'iris avec vascularisation intrinsèque. (C) Fond de l'œil montrant une petite tumeur pigmentée de la choroïde. (D) Grosse tumeur de la choroïde. Figure et légende adaptée de (Shields et al, 2015)

2.1.4. Facteurs pronostiques

La localisation et la taille de la tumeur sont deux caractéristiques qui permettent de définir le pronostic évolutif de la tumeur. Les mélanomes du corps ciliaire et les tumeurs volumineuses ont le plus mauvais pronostic de survie alors que les petites tumeurs et les mélanomes de l'iris sont associés à un bon pronostic. Ces associations ne sont pas étonnantes puisqu'au moment du diagnostic, les tumeurs postérieures, cachées derrière l'iris, sont souvent plus grosses que les tumeurs antérieures.

Lorsque la tumeur est trop volumineuse une ablation chirurgicale de l'œil est effectuée. Les analyses anatomopathologiques réalisées sur l'œil énuclé confirment la taille et la localisation de la tumeur. D'autres caractéristiques de la tumeur, également utilisées comme facteurs pronostiques, sont déterminées lors des examens histopathologiques et cytogéniques. Sont évalués la morphologie des cellules, l'index mitotique, l'infiltration de la sclérotique, du nerf optique et du corps ciliaire, la présence de boucles vasculaires et d'anomalies chromosomiques (Damato et al. 2007; Coupland et al. 2008). 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 sont associées à un mauvais pronostic métastatique (Damato et al. 2007) tandis que les tumeurs constituées de cellules fusiformes ont moins tendance à migrer et sont ainsi associées à un bon pronostic.

Le caractère invasif des mélanomes mixtes dépend du pourcentage de cellules épithélioïdes dans la tumeur. Une activité mitotique élevée, une atteinte extra-sclérale et la formation de patrons microvasculaires sont également associées à un mauvais pronostic (Singh AD et al 2001 et 2005). Outre les facteurs pronostics cytopathologiques, les tumeurs de mélanome uvéal sont caractérisées par des réarrangements chromosomiques simples et récurrents dont certains corrélerent avec un haut risque métastatique et un mauvais pronostic de survie des patients. Les anomalies chromosomiques du mélanome uvéal seront détaillées dans la section 2.2 de cette partie.

2.1.5. Traitements de la tumeur primaire

Pendant de nombreuses années l'énucléation était considérée comme la seule option thérapeutique au mélanome uvéal, mais le développement de traitements dits conservateurs à partir des années 1970, a permis de proposer une alternative de traitements moins agressifs aux patients atteints de mélanome uvéal. Ces traitements apportent un avantage fonctionnel, esthétique et psychologique puisqu'ils permettent de détruire la tumeur en préservant au mieux l'œil et la vue.

Le choix du traitement est décidé selon de (a) la taille de la tumeur, (b) sa localisation dans l'œil, (c) l'âge du patient, (d) la présence d'une extension extra-sclérale et (e) la présence d'autres maladies oculaires ou systémiques (exemple : diabète et risques de complication après la radiothérapie).

L'énucléation est proposée lorsque la tumeur - souvent postérieure- est d'un diamètre supérieur à 18mm et d'une épaisseur supérieure à 10mm, et 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 tumeurs de l'iris, souvent plus petites, sont excisées du globe oculaire (Shields et al, 2015).

Les deux techniques conservatrices principales actuellement utilisées sont :

La curiethérapie est la méthode la plus couramment utilisée en dehors de l'Europe et notamment Amérique du Nord. Elle est proposée indépendamment du site d'origine de la tumeur, de sa taille ou de sa forme. Ce traitement consiste à appliquer un disque d'or radioactif sur la tumeur. Cette plaque peut contenir des grains d'iode 125 (le plus souvent) ou de ruthénium 106 qui émettent des rayons γ et β respectivement.

La protonthérapie traite la tumeur par des faisceaux de protons. Cette technique cible précisément les tumeurs en évitant l'irradiation des tissus sains adjacents de la tumeur. 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 sont traités sur le site d'Orsay de l'institut Curie.

Depuis plusieurs années les traitements conservateurs sont favorisés en raison de leurs avantages. Statistiquement aucun effet négatif est observé, mais aucune différence convaincante existe au niveau de la survie de patients entre les deux approches conservatrices et non conservatrices (de Potter et al 199 et 2002, COMS 2001). Cette observation suggère une dissémination précoce du mélanome uvéal avant le diagnostic et le traitement de la tumeur primaire. A ce stade, indépendamment de la prise en charge de la tumeur primaire, le pronostic de survie du patient est mauvais (Singh 2001). Une échographie, souvent réalisée au moment du diagnostic puis en suivi, permet de vérifier l'atteinte du foie par les métastases, quand la croissance a débuté.

2.1.6. Evolution métastatique

En dépit des avancées des traitements de la tumeur primaire et d'une prise en charge efficace, la mortalité reste inchangée depuis plus de 40 ans. Les données de la littérature sont variables, 25% à 50% des patients développent des métastases dans les 3 ans, et jusqu'à 15 ans, suivant le traitement de la tumeur primaire (Shields et al. 2015a; COMS report n°15, 2001 et 2004). En raison de l'importante vascularisation de la choroïde et de l'absence de structures lymphatiques intraoculaires, le mélanome uvéal dissémine par voie hématogène (Barnhill, Ye, Batistella, M.-H. Stern, et al. 2017), puis évolue majoritairement dans le foie. La dissémination des cellules tumorales par voie lymphatique est très rare dans ces cancers. Elle est possible seulement lorsque la sclérotique antérieure est rompue, que les cellules ont accès aux vaisseaux sanguins de la conjonctive et peuvent ainsi migrer vers les ganglions lymphatiques locaux (Dithmar et al. 2000)(Ardjomand et al. 2005). 90% des patients développent des métastases hépatiques et plus rarement des métastases pulmonaires (24%) osseuses (16%), cérébrales et cutanées (COMS 2001 rapport 15). Les complications systémiques qui résultent de l'atteinte du foie sont les principales causes de décès des patients. L'espérance de vie

après survenue des complications associées aux métastases hépatiques est de 6 mois (COMS 2005). Lorsque c'est envisageable, les métastases sont traitées par chirurgie hépatique ou par chimiothérapie intra-hépatique ou systémique mais les résultats de ces traitements sont décevants puisqu'ils prolongent faiblement l'espérance de vie (voir section 2.5). Une hypothèse expliquant ce faible pronostic est l'inefficacité des agents thérapeutiques utilisés, ce qui souligne l'importance du développement de nouveaux traitements plus efficaces.

La dissémination précoce et le caractère agressif du mélanome uvéal ont encouragé les groupes de recherches à investiguer et développer différentes formes de traitements adjuvants destinés aux patients de mauvais pronostic. Durant ces dernières décennies, des efforts considérables ont été réalisés dans le but de (1) mieux comprendre les altérations génétiques impliquées dans le développement et la progression du mélanome uvéal, dans le but de détecter au diagnostic les tumeurs à haut risque de métastases et (2) d'identifier les voies de signalisation et les molécules dérégulées dans les mélanocytes tumoraux qui pourraient être ciblées par les molécules à effet thérapeutique.

2.2. Anomalies chromosomiques

Comme décrit précédemment certains facteurs connus, cliniques et histologiques, sont associés à un mauvais pronostic (Age > 60 ans, diamètre de la tumeur > 16mm, localisation au corps ciliaire, l'extension extra sclérale, les anomalies vasculaires et le type cellulaire épithélioïde). Cette méthode de prédiction, bien qu'elle soit fiable, ne corrèle pas toujours avec la survenue des métastases hépatiques (baggio 2005 et Harbour 2009). L'utilisation de techniques d'analyses génomiques et transcriptomiques (voir section 2.3) sur les tumeurs de mélanome uvéal représente des outils à visée pronostique plus récents et précis.

L'analyse du caryotype, l'hybridation génomique comparative (CGH), l'hybridation in situ en fluorescence (FISH) ou l'amplification multiplex de sonde nucléique dépendant des ligatures (MLPA) ont considérablement amélioré le pronostic de cette pathologie et ont montré que les mélanomes uvéaux présentent des anomalies chromosomiques non-aléatoires et simples qui corrélerent avec la survie des patients (Kilic et al. 2006; Cassoux et al. 2014; Ehlers et al. 2008) . Les aberrations chromosomiques sont une caractéristique des cellules cancéreuses. Elles peuvent altérer le nombre et la structure des chromosomes dans leur totalité ou uniquement sur l'un des bras (bras long (q) et/ou bras court (p)).

Dans le mélanome uvéal, des aberrations récurrentes se trouvent principalement sur les chromosomes 1, 3, 6, et 8 (Trolet et al. 2009; Cassoux et al. 2014; Van Den Bosch et al. 2010). Les réarrangements des chromosomes 8 (gain) et 3 (monosomie) sont souvent combinés et fréquents, tandis que le gain des chromosomes 1 et 6 est moins fréquent que les précédents. D'autres réarrangements moins récurrents ont été reportés sur les chromosomes 16 (Trolet et al. 2009), 7, 9 et 10 (Van Den Bosch et al. 2010) mais leur implication dans le développement et la progression du mélanome uvéal n'a pas encore été investigué. Ils ne seront pas décrits dans la suite de cette section.

Chromosome 3 : La monosomie du chromosome 3 est l'aberration chromosomique la plus fréquemment retrouvée dans les mélanomes uvéaux. Cette perte d'une des deux copies du chromosome s'observe dans 50% des tumeurs primaires (Kilic et al. 2006). Contrairement à la disomie, la monosomie du chromosome 3 est associée à un mauvais pronostic et corrèle avec l'apparition métastatique (Cassoux et al. 2014). En outre, elle est corrélée aux caractéristiques cliniques et histologiques de mauvais pronostics telles que le type épithélioïde des cellules, le large diamètre, et l'implication du corps ciliaire (Scholes et al. 2003). La monosomie du chromosome 3 apparaît comme un évènement précoce dans le développement du mélanome uvéal puisqu'il est généralement associé à d'autres anomalies chromosomiques connues (Van Den Bosch et al. 2010).

Dans de rares cas, la perte d'une copie du chromosome 3 est due à une isodisomie, une copie du chromosome est perdue et la copie restante est dupliquée. La cellule se retrouve avec deux copies identiques du chromosome 3 mais la tumeur se comporte comme une tumeur présentant une monosomie. Des délétions partielles du chromosome 3 sont épisodiquement retrouvées et touchent des régions alléliques contenant des gènes suppresseurs de tumeurs (3P25 et 3Q24-26) (Onken et al. 2007; Trolet et al. 2009).

Chromosome 8 : L'altération du chromosome 8 correspond à un gain du bras long (8q) retrouvé dans ~ 40% des cas des mélanomes uvéaux. Cette amplification est souvent combinée aux altérations des chromosomes 3 ou 6 et serait un évènement tardif qui ferait suite à l'apparition des anomalies de ces chromosomes (Ehlers et al. 2008)(Onken et al. 2004). 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 chromosome 8 sur le bras long 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) (Ehlers & Harbour 2005) et DDEF1 (8q24) (Ehlers et al. 2005) ou d'autres gènes tels que PTP4A3 /PRL-3(8q24.3) (Laurent et al. 2011) pourraient être des facteurs contribuant du développement du mélanome uvéal.

Chromosome 6 : les altérations touchant le chromosome 6 se manifestent notamment par une amplification du bras court (6p) et une perte du bras long (6q). Ces anomalies sont précoces durant le développement de la tumeur et sont fréquentes dans le mélanome uvéal et cutané (Damato et al. 2010). L'amplification du 6p est trouvée dans un quart des mélanomes uvéaux où elle est associée aux cellules fusiformes et à un faible risque métastatique. La perte du 6q se retrouve dans plus de 25% des tumeurs et est corrélée avec un fort risque métastatique.

Chromosome 1 : Il s'agit de délétions sur le bras court du chromosome 1 (1p). La région la plus souvent délétée se trouve dans la région chromosomique comprise entre le 1p34.3 et 1p36.2. Les délétions du 1p sont retrouvées dans les tumeurs primaires de mélanome uvéal qui ont métastasé et dans les métastases, suggérant la présence d'un gène suppresseur de tumeur dans cette région (Trolet et al. 2009) . Quand elle est associée à la monosomie du chromosome 3, la perte du 1p présente une plus forte corrélation avec le mauvais pronostic métastatique comparé aux tumeurs qui ont une disomie du chromosome 3.

Les associations entre ces altérations chromosomiques représentent d'importants indicateurs prédictifs du risque métastatique et de la survie des patients. La combinaison de la monosomie du chromosome 3, des délétions du 1p, et de l'amplification 8q est corrélée 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 (Ehlers et al. 2008). La monosomie du chromosome 3 couplée au gain du 8q est considérée comme le facteur de risque le plus significativement corrélé à une forte mortalité et est associé aux facteurs de mauvais pronostics cliniques et histologiques (Cassoux et al. 2014; Damato et al. 2010; Bosch 2012). 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 (Figure I.5).

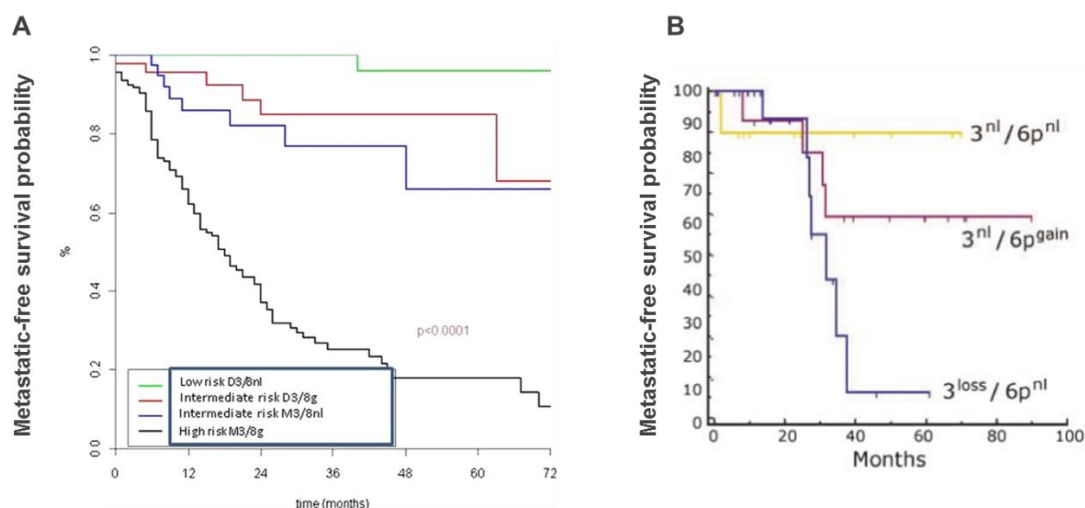


Figure I.5: Courbes de survie Kaplan-Meier selon les statuts des chromosomes 3, 8 et 6. (A) Analyse de survie Kaplan-Meier montrant le taux de survie sans métastases selon les sous-groupes de tumeurs portant des anomalies sur les chromosomes 3 et 8. M3/8nl (disomie du 3, chr 8 normal); D3/8g (disomie du 3, gain du chr 8); M3/8nl (monosomie du 3, chr 8 normal) et M3/8g (monosomie 3 et gain du chr 8). Adaptée de(Cassoux et al. 2014). (B) 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 6. 3^{nl}/6p^{nl} (disomie du 3 et bras court du chr 6 normal); 3^{nl}/6p^{gain} (disomie du 3 gain du 6p); 3^{loss}/6p^{nl} (monosomie du 3 et 6p normal). Adaptée de(Ehlers et al. 2008). chr : chromosome.

Sur la base de ces réarrangements chromosomiques et du statut du chromosome 3, des analyses de classification ont permis de diviser les tumeurs de mélanomes uvéaux en deux groupes fonction du statut du chromosome 3 et de leur pronostic. Les tumeurs avec une monosomie du chromosome 3 et un gain du 8q forment le groupe de mauvais pronostic alors que les tumeurs présentant une disomie du chromosome 3 et un gain du 6p appartiennent au groupe de bon pronostic (Hughes et al. 2005).

De la même manière, une analyse de ségrégation réalisée sur une cohorte de tumeurs de l'institut Curie dans le but de rechercher des signatures moléculaires du développement métastatique ont permis de classifier les tumeurs en deux groupes corrélés au statut métastatique. Dans cette analyse, Trolet et al compare des tumeurs primaires de patients qui ont développé des métastases hépatiques dans les trois ans suivant une énucléation (méta1) avec des patients qui n'ont pas développé de métastases à trois ans (méta0) (Trolet et al. 2009). Cette étude valide l'intérêt pronostique de la classification sur la base du statut du chromosome 3. Dans les tumeurs, l'association de la monosomie du 3, du gain du 8q et du 16p présente le plus haut taux de développement métastatique (60% meta1); tandis que l'association du gain du 6p et du 8q distal sont de bon pronostic et ont une faible propension à métastaser (40% meta0). Sur les 63 métastases hépatiques analysées par Trolet et al, 17% présentent les caractéristiques chromosomiques retrouvées dans les tumeurs primaires méta0, et 82% celles décrites dans les tumeurs primaires méta1 (Trolet et al. 2009). Cette étude valide l'intérêt pronostique de la classification sur la base du statut du chromosome 3 et révèle l'existence d'une sous-division de la classe de bon pronostic meta 0.

2.3. Classification des tumeurs selon leur profil d'expression génique

Outre le pouvoir prédictif des anomalies cliniques cytopathologiques et chromosomiques, la classification et la prédiction du risque métastatique peut aussi être faite sur la base du profil d'expression des gènes (GEP) des tumeurs de mélanome uvéal. La notion de groupe abordée ci-dessus a d'abord été initiée par le groupe d'Harbour en 2004 d'après l'analyse transcriptomique d'un panel de 25 tumeurs primaires de mélanome uvéal. La comparaison des profils des gènes des tumeurs permet d'identifier deux groupes référencés selon leur potentiel métastatique. La classe 1 est caractérisée par un faible risque métastatique; La classe 2 est associée à un haut risque métastatique (figure I.6 et figure I.7) (Onken et al. 2004). Le profil d'expression des gènes de la classe 2 est fortement corrélé aux facteurs cliniques et chromosomiques de mauvais pronostic, tels que la taille de la tumeur, les cellules épithélioïdes, les patrons micro-vasculaires et la monosomie du 3, cependant le pronostic du GEP est plus précis et plus fiable que les autres facteurs classiques pris individuellement ou en combiné. Une signature de 62 gènes discriminant les deux classes inclut des gènes du chromosome 3 sous-exprimés et des gènes du chromosome 8 surexprimés, en cohérence avec les résultats cytogénétiques précédents (Onken et al. 2004).

Les gènes les plus discriminants ont été utilisés afin de créer un kit d'analyse prédictif pour les tumeurs de mélanome uvéal qui a été validé sur plus de 500 patients aux Etats-Unis. Ce test basé sur le profil d'expression de 12 gènes (+3 gènes contrôles) par PCR quantitative a été breveté et est aujourd'hui commercialisé aux Etats-Unis et au Canada sous le nom de DecisionDx-UM (Onken et al. 2010) (Figure I.6).

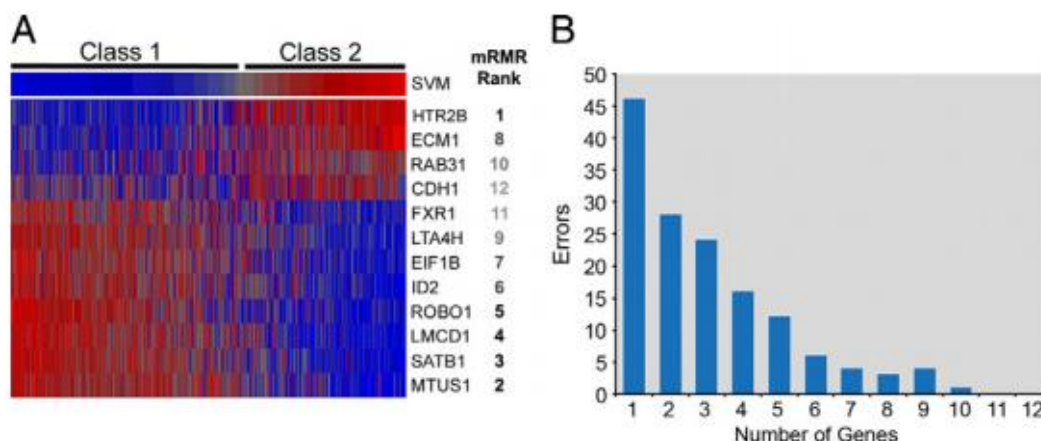


Figure I.6 : Profils d'expression des 12 gènes permettant la prédiction métastatique dans le mélanome uvéal. (a) Cartographie montrant l'expression normalisée des 12 gènes qui permettent la discrimination des deux classes de mélanome uvéal. (Bleu: faible expression relative; rouge: haute expression relative; gris: expression intermédiaire). (b) Classification du degré d'erreur fonction du nombre de gènes discriminants utilisés dans l'analyse de prédiction. Les gènes ont été supprimés progressivement en fonction de leur rang. A titre d'exemple: le gène HTR2B est au rang 1, sa suppression induit une analyse sur un panel de 11 gènes et donne un taux d'erreurs très faible. Figure et légende adaptée de (Onken et al. 2010)

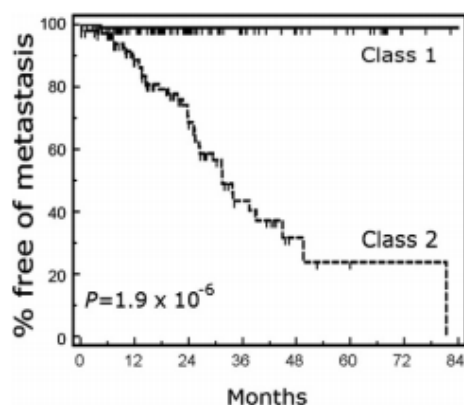


Figure I.7 : Courbes de survie Kaplan-Meier selon la classe de tumeurs de mélanome uvéal. Analyse Kaplan-Meier montrant la survie sans métastases en fonction de la catégorisation en classe 1 ou 2 de 172 patients atteints de mélanome uvéal. Figure et légende adaptée de (Onken et al. 2010)

2.4. Aspects génétiques du mélanome uvéal: mutations, surexpressions et mécanismes dérégulés

Les analyses comparatives moléculaires ont eu une contribution supplémentaire considérable dans la compréhension de la pathogénèse du mélanome uvéal ; mettant en avant des anomalies génétiques et des dérégulations moléculaires des voies de signalisation. Ces anomalies « responsables » du développement et de la progression du mélanome uvéal incluent (1) des mutations dans des gènes « drivers » GNAQ /GNA11, PLCB4, CYSLTR2, EIFAX, SF3B1 et BAP1 ; et (2) des surexpressions de gènes incluant PTEN, PRL-3 et PRKDC.

2.4.1. Mutations initiatrices du mélanome uvéal : GNAQ/ GNA11 et PLCB4, CYSLTR2 et implication dans les voies MAPK et PI3K/AKT

Les techniques de séquençage de nouvelles générations ont permis d'identifier des mutations « drivers » dans la progression du mélanome uvéal. Le terme « driver » est employé pour des mutations qui sont impliquées dans la tumorigénèse et qui apportent un avantage sélectif au développement de la tumeur. Dans le cadre du mélanome uvéal ces mutations sont portées sur des gènes signatures impliqués dans la progression tumorale du mélanome uvéal. Les gènes identifiés sont : GNAQ, GNA11, BAP1, EIF1AX, et SF3B1. Deux autres gènes, PLCB4 et CYSLTR2 ont plus récemment été révélés. Les mutations dans ces gènes apparaissent, dans la majorité des cas, de manière exclusive c'est-à-dire que la présence de certaines mutations sont incompatibles entre elles (Decatur et al. 2016; Moore et al. 2016). Ces gènes sont associés à différents risques métastatiques et ont, par voie de fait, une importance dans le pronostic de survie des patients (Figure I.8 et tableau I.2).

D'autres gènes présentant des mutations somatiques, ont été trouvés dans un panel de plusieurs tumeurs et incluent les gènes TP53BP1, CSMD1, TTC28, DLK2, et KTN1. Cependant leur association avec la pathogénèse du mélanome uvéal n'ayant pas encore été décrite, ils ne seront pas détaillés dans la suite de cette partie (Royer-Bertrand et al. 2016).

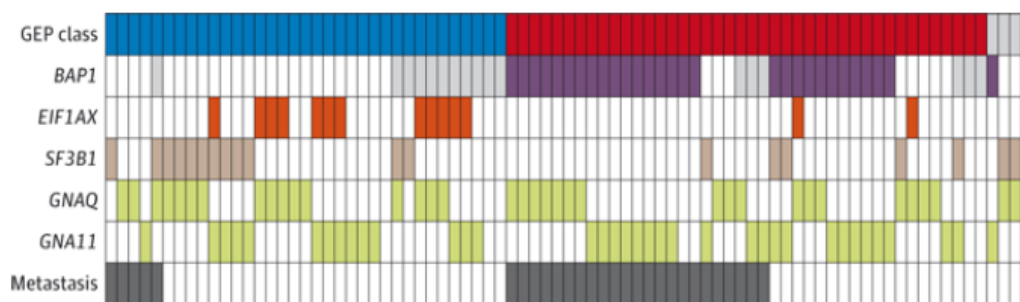


Figure I.8: Vue d'ensemble des gènes drivers mutés dans le mélanome uvéal, de la classification selon le profil d'expression des gènes (GEP) et du statut métastatique. Analyse de 81 tumeurs de mélanome uvéal classées selon leur profil d'expression génique en classe 1 (en bleu) et en classe 2 (en rouge). Une case représente une tumeur. Les cases blanches indiquent l'absence de mutation et les cases colorées la présence de mutations. Les informations de certaines tumeurs ne sont pas disponibles (cases grises claires). Les tumeurs présentant une mutation GNA11 ne présentent pas de mutation dans le gène GNAQ et vice versa. Ces mutations sont incompatibles l'une avec l'autre. Les mutations BAP1 sont exclusivement retrouvées dans les tumeurs de classe 2 et sont quasi-incompatibles avec les mutations SF3B1 et EIF1AX, elles-mêmes quasi incompatibles entre-elles. Sur un suivi moyen de 34.1 mois, 35% des patients ont développé des métastases (28/81). Parmi les tumeurs primaires qui ont métastasé, 71% portaient des mutations dans BAP1 (17/24) et étaient de classe 2. Des mutations ont été détectées dans GNAQ et GNA11 dans 46% (13/28) et 43% (12/28) des tumeurs métastatiques ; SF3B1 dans 3/28 (11%) et aucune mutation de EIF1AX n'a été détectée dans les tumeurs qui ont métastasé. 26% des patients sont morts des suites des complications du mélanome uvéal. Figure et légende d'après (Decatur et al. 2016)

Mutations activatrices des GNAQ et GNA11 et implication dans la voie des MAPK

Les gènes paralogues GNAQ et GNA11 codent les sous-unités alpha Gaq et Ga11 des protéines G hétérotrimériques couplées aux récepteurs transmembranaires. Ces sous-unités assurent l'échange du GDP en GTP permettant ainsi leur activation et le clivage du phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PIP₂) en inositol trisphosphate (IP₃) et diacylglycérol (DAG) par PLCβ (1-Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate phosphodiesterase beta-1). DAG active ensuite la protéine kinase C (PKC) qui vient activer les voies en aval dont la voie de signalisation MAPK (Van Raamsdonk et al. 2010; Onken et al. 2008)

La voie MAPK est constituée d'une famille de protéines dont la fonction sérine/thréonine kinase est conservée au cours de l'évolution. Il existe quatre grandes familles de MAP Kinases : Les kinases ERK (1, 2,3), Les kinases JNK (1, 2, 3, c-jun et NH₂ terminal kinase), les kinases p38 (α, β, γ, δ) et la famille de la nouvelle kinase ERK5 (Zhou et al. 1995). Chaque famille est activée par la transduction d'un signal provenant de l'activation de récepteurs transmembranaires différents en réponse à des stimuli extracellulaires. C'est notamment le cas des récepteurs à activité tyrosine kinase ou les récepteurs couplés aux protéines G qui vont induire l'activation de trois kinases successives par une cascade de phosphorylation (Figure I.9). Cette voie contrôle les signaux de transduction de la différenciation, la prolifération, la survie et l'apoptose, la migration cellulaire ainsi que la réponse au stress (Figure I.10). Elle est activée dans de nombreux cancers dont le mélanome uvéal et le mélanome cutané et est clairement impliquée dans la transformation tumorale.

La voie MAPK est constitutivement active dans 86% des mélanomes uvéaux. Cependant et contrairement au mélanome cutané, cette activation de la voie ne résulte pas des mutations activatrices dans les gènes NRAS ou BRAF, la plus commune étant BRAF V600E (Weber et al. 2003) (Zuidervaart et al. 2005). Ces mutations sont rares dans le mélanome uvéal, à l'exception du sous-ensemble venant de l'iris. Il a en effet révélé que des mutations BRAF étaient présentes dans 50% des mélanomes de l'iris (Henriquez et al. 2007). Ce profil mutagène peut-être expliqué par la localisation antérieure et plus exposée aux UVs de l'iris par rapport au corps ciliaire et à la choroïde. Les mutations du gène NRAS également présentes dans le mélanome cutané, ne sont pas reportées dans le mélanome uvéal. (Zuidervaart et al. 2005).

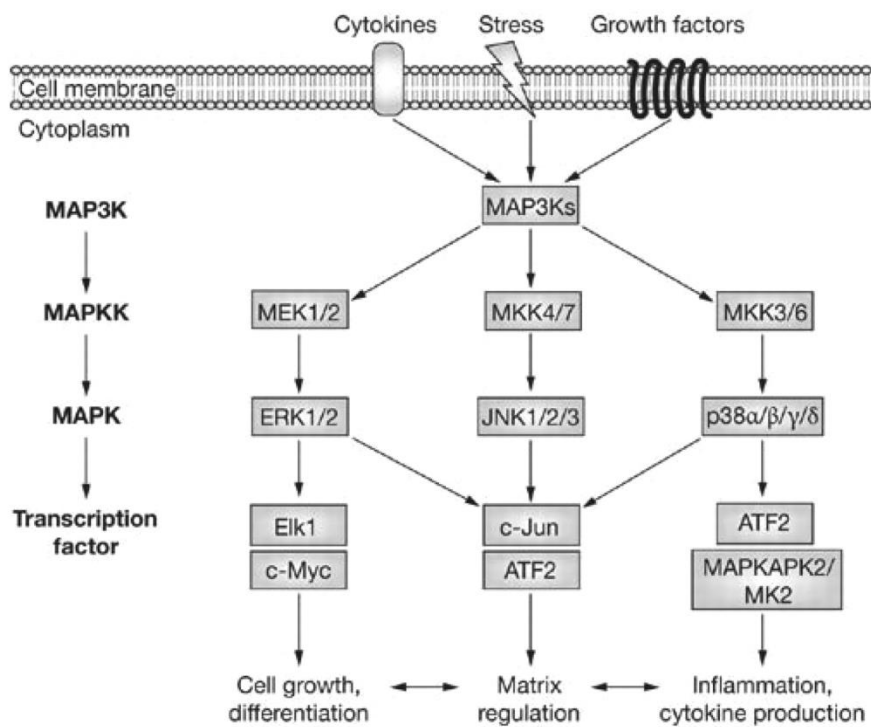


Figure 1.9: Cascades d'activation des MAP Kinases. Représentation des différents niveaux des cascades des MAPK incluant 3 des 4 cascades ERK, p38, JNK/jun et ERK5. La voie ERK est initiée en réponse aux facteurs de croissance, tandis que les voies JNK, P38 et ERK sont activées en réponse aux cytokines, au stress environnemental (tel que: choc osmotique et irradiation), ou à d'autres stimuli extracellulaires. La MAPK kinase est activée par phosphorylation par un activateur en amont. Cette MAPKKK activera par phosphorylation la MAPKK, qui activera à son tour la MAPK. Dans la voie ERK la MAPKKK est une protéine Raf (A-Raf, B-Raf ou C-Raf). Figure et légende adaptées de (D Hammaker et GS Firestein, 2009)

Environ 83% des mélanomes uvéaux portent des mutations sur les gènes GNAQ ou GNA11 (Van Raamsdonk et al. 2010). Les mutations observées sont activatrices et exclusives aux codons Q209 (95% des cas) ou R138 (5% des cas).

Ces mutations entraînent une activation constitutive des sous-unités Gαq et Gα11 en bloquant leur activité GTPase intrinsèque. Il en résulte une transduction du signal intracellulaire anormale et une activation de la voie MAPK (mitogen-activated protein kinase) (Van Raamsdonk et al. 2010; Onken et al. 2008).

L'absence de mutation dans les gènes NRAS et BRAF dans le mélanome uvéal est un argument qui identifie les mutations activatrices des gènes GNAQ et GNA11 comme responsables majeures de l'activation constitutive de la voie MAPK via la signalisation des protéines G et probablement par l'activation de ERK (Zuidervaart et al. 2005; Weber et al. 2003; Calipel et al. 2006). Une récente étude identifie le facteur d'échange GTP RasGRP3 comme une cible en aval des protéines GNAQ et responsable de l'activation de la voie MAPK dans le mélanome uvéal (X. Chen et al. 2017).

Par le biais de la voie MAPK, les mutations activatrices des gènes GNAQ et GNA11 jouent un rôle primordial dans l'apparition de la tumorigénèse dès la transformation mélanocytaire. En effet, une étude comparant les naevi, les tumeurs et les métastases de mélanome uvéal montre que la mutation du codon Q209 dans GNAQ est observée dans 55% des naevi, 45% des tumeurs primaires et 22% des métastases. A l'inverse, cette même mutation dans le gène GNA11 est montrée dans 6% naevi, 32% des tumeurs primaires et 56% des métastases. La mutation du codon R183 est rare et présente dans 2% des naevi et ~6% des mélanomes uvéaux mutés sur GNAQ et GNA11 cumulés (Van Raamsdonk et al. 2010). Ces mutations dans GNAQ et GNA11 constituent un évènement précoce dans le développement du mélanome uvéal. Bien que les mutations GNA11 Q209 soient plus associées aux métastases, les mutations de ces gènes ne permettent pas de distinguer les deux classes de mélanome uvéaux et ne sont pas associées au pronostic de survie des patients et au risque métastatique.

Jusqu'à très récemment, la(les) altération(s) responsable(s) du développement de la pathologie dans les 15% des tumeurs ne présentant pas de mutations GNAQ et GNA11 était(en)t inconnue(s).

En 2016, les groupes de Hayward et Yu chen ont identifié de nouvelles mutations sur les gènes PLCB4 et CYSLTR2 qui codent des protéines en aval et amont respectivement des protéines hétérodimériques G (Johansson et al. 2016; Moore et al. 2016) (Figure I.8).

PLCB4 : une protéine en aval des protéines G α

Sur les deux jeux de tumeurs analysées par P. Johansson et al, PLCB4 (phospholipase C, beta 4) était le seul autre gène qui portait une mutation unique et récurrente à l'exception des gènes déjà connus dont GNAQ et GNA11. (2/23 et 1/56 tumeurs positives pour la mutation PLCB4 D630Y). Cette mutation D630Y est localisée dans le domaine catalytique de PLCB4, qui joue un rôle vital dans la transduction intracellulaire des signaux extracellulaires de la rétine. PLCB4 clive le PIP2 en IP3 et DAG menant à la stimulation de PKC et l'activation de la voie MAPK (Figure I.10). Cette protéine est un effecteur en aval des sous-unités G α_q et G α_{11} qui est activé par interaction directe avec G α_q . Sur les trois tumeurs présentant la mutation, aucune n'exprimait des mutations sur GNAQ ou GNA11 suggérant le caractère incompatible de ces mutations. Plusieurs mutations sont également retrouvées le long du gène PLCB4 dans le mélanome cutané (21% à 28%) mais de façons moins récurrentes entre la tumeur. Contrairement au mélanome cutané, la mutation D630Y présente dans le mélanome uvéal est une mutation gain de fonction qui résulte en l'activation de la voie MAPK (Johansson et al. 2016).

CYSLTR2 : mutation dans le récepteur transmembranaire couplé aux protéines G

Amanda Moore et al ont identifié une mutation récurrente sur le gène CYSLTR2 (Cysteinyl Leukotriene Receptor 2) dans 4 des 9 tumeurs dépourvues de mutations sur les gènes GNAQ, GNA11 et PLCB4 mais dans aucune tumeur (0/127) portant des mutations sur l'un de ces gènes. La mutation CYSLTR2 est donc incompatible avec les mutations sur GNAQ, GNA11 ou PLCB4. Le gène CYSLTR2 (Cysteinyl Leukotriene Receptor 2) code un récepteur transmembranaire couplé aux protéines G (GPCR), qui s'active en réponse aux leucotriènes en cas d'inflammation et de la fibrose. CYSLTR2 appartient à une famille de GPCR qui active la sous-unité Gαq des protéines G. Dans les tumeurs de mélanome uvéal, CYSLTR2 porte la mutation Leu129gln dans une région très conservée qui stabilise le récepteur dans sa position inactive. Cette mutation active constitutivement le récepteur indépendamment d'une stimulation au leucotriène permettant son interaction avec la protéine hétérotrimérique G, et conduit à l'activation de la voie MAPK, la prolifération des mélanocytes *in vitro* et la croissance tumorale *in vivo* (Figure I.10) (Moore et al. 2016).

Mutations activatrices GNAQ et GNA11 et implication dans la voie Hippo et la voie PI3K /AKT/mTor

Le rôle des mutations activatrices de GNAQ et GNA11 dans le mélanome uvéal ne se résume pas uniquement à l'activation de la voie MAPK. Les effets de l'activation des protéines Gα incluent également l'activation des voies Hippo et PI3K/Akt/mTor.

La voie de signalisation Hippo est un élément clé dans le contrôle de la taille des organes, l'homéostasie tissulaire, la prolifération cellulaire et l'apoptose (Yu et al. 2015). D'abord découvert chez la drosophile, les protéines impliquées dans cette cascade de phosphorylation sont conservées chez les mammifères. Quand la voie est active, les facteurs de transcription YAP et TAZ sont phosphorylés et inactivés par la sérine/thréonine kinase LATS1/2, induisant leur rétention cytoplasmique par interaction avec la protéine 14-3-3. La phosphorylation de YAP/TAZ conduit également à sa polyubiquitination et sa dégradation par le protéasome. La transcription des gènes cibles de YAP est donc réprimée. Quand 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. L'analyse de lignées cellulaires et de tumeurs primaires de mélanome uvéal montre une forte corrélation entre le statut mutagène de GNAQ et GNA11 et YAP activée, par l'augmentation de sa localisation nucléaire et la diminution de sa phosphorylation. De plus l'inhibition de GNAQ par interférence ARN dans une lignée de mélanome uvéal 92.1 mutée dans GNAQ induit une phosphorylation de YAP et par conséquent son inactivation (F.-X. Yu et al. 2014).

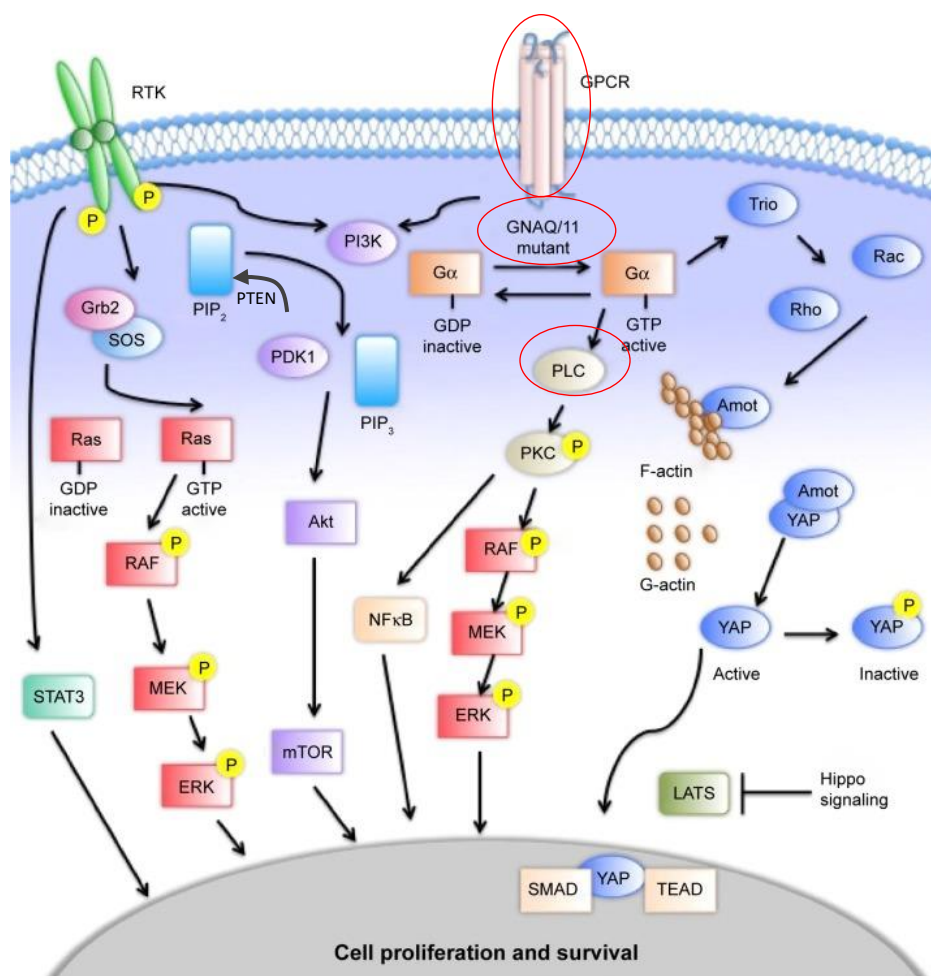


Figure I.10: Voies de signalisation impliquées dans le mélanome uvéal. Les voies MAPK, PI3K/AKT/mTOR, Hippo sont impliquées dans la tumorigénèse du mélanome uvéal. Les protéines $G\alpha$ sont activées en réponse de la fixation d'un ligand sur le récepteur couplé aux protéines G (GPCR): CYSLTR. L'activation des protéines $G\alpha$ assure l'échange 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 $G\alpha$. 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. Abbreviations: PIP2: phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate; PIP3: phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate; $G\alpha$: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)

Cependant la régulation de la voie hippo ne se résume pas à une cascade d'activation linéaire dépendante de LATS1. Plusieurs recherches ont montré l'intervention de différents acteurs en amont de la voie. Dans un contexte oncogénique GNAQ et GNA11, Feng et al ont mis en évidence l'activation de YAP via la signalisation TRIO/Rho/Rac et la polymérisation de l'actine. Sous l'effet d'une protéine TRIO activée par les protéines $G\alpha$ /GNA11 mutées, l'activation de RhoA et Rac1 induit la polymérisation de la G-actine en F-actine entraînant la dissociation de la protéine adaptatrice AMOT (cytoskeletal-associated protein angiomin) avec YAP, YAP transloque dans le noyau et active la transcription de ses gènes cibles (Figure I.10) (Yu et al. 2015). De ce fait, l'activation de YAP par les sous-unités $G\alpha$ et

Gα11 oncogéniques est observée dans un contexte dépendant de LATS1/2 comme dans un contexte indépendant de la voie canonique hippo par la polymérisation de l'actine (Feng et al. 2014).

La voie PI3K/AKT/mTor (PhosphoInositide 3-kinase) joue un rôle crucial dans un large éventail de fonctions cellulaires dont la croissance et l'homéostasie. Les PI3K kinases sont activées directement par des récepteurs à activité tyrosine kinase ou par l'intermédiaire des protéines RAS (de la voie MAPK), elle-même activée par des récepteurs couplés aux protéines G. La PI3 Kinase (PI3K) catalyse la phosphorylation du PIP3 (PhosphoInositol-3,4,5-triPhosphate) à partir du PIP2. PIP3 recrute sérine/thréonine kinase AKT à la membrane plasmique, où elle est phosphorylée et activée par PDK1 (phosphatidylinositol 3-dependent kinase 1), permettant ainsi l'activation de ses nombreuses cibles impliquées dans les processus cellulaires comme la prolifération et la survie cellulaire (Figure I.10). L'activation/phosphorylation constitutive d'Akt a été montrée dans différentes lignées cellulaires (92.1, Mel270, OCM1, TP31) et tumeurs de mélanome uvéal (Babchia et al. 2010; Saraiva et al. 2005). Il a aussi été montré que 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 (Babchia et al. 2010; Saraiva et al. 2005).

La phosphatase PTEN (phosphatase and tensin homologe deleted on chromosome 10) agit comme régulateur négatif de la voie PI3K en permettant la conversion du PIP3 en PIP2 ce qui empêche l'activation de AKT menant ainsi à l'apoptose (Figure I.10). L'expression de PTEN est diminuée dans différents types de cancers chez l'homme dont le mélanome cutané. PTEN est un gène suppresseur de tumeur qui agit dans la voie PI3K comme un régulateur négatif. La diminution ou la perte totale d'expression de PTEN mène à l'activation aberrante d'AKT et empêche l'apoptose des cellules tumorales (Ehlers et al. 2008; Ibrahim & Haluska 2009). Abdel Rahman et al rapportent une diminution et une perte totale de l'expression de PTEN dans ~60% (44/75) des tumeurs primaires de mélanome uvéal qui serait associée à un mauvais pronostic et au devenir des patients (Abdel-Rahman et al. 2006). Ils suggèrent également que cette modification d'expression serait entraînée par une microdélétion du chromosome 10 dans la région portant le gène PTEN (10q23.3), les mutations dans cette région étant rares (Abdel-Rahman et al. 2006). 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.

Tandis que les protéines Gα mènent indirectement à l'expression de gènes via l'activation de plusieurs cascades de signaux, d'autres gènes affectés dans le mélanome uvéal codent des protéines directement impliquées dans la transcription et la traduction. Les mutations de ces gènes - BAP1, SF3B1 et EIF1X – ont un impact important mais opposé dans la progression du mélanome uvéal. Contrairement aux mutations du gène BAP1 qui sont de mauvais pronostic, les mutations des gènes SF3B1 et EIF1AX sont associées à un faible risque métastatique.

2.4.2. Mutations corrélées et inversement corrélées à la progression métastatique du mélanome uvéal : BAP1, SF3B1 et EIF1AX

Mutations « perte de fonction » du gène suppresseur de tumeur : BAP1

BAP1 (BRCA1 associated protein-1) est un gène suppresseur de tumeur hémizygote inactif dont l'un des allèles a été perdu avec la perte d'une des copies du chromosome 3 et dont l'allèle restant présente des mutations inactivatrices qui conduisent à une perte de fonction ou à une perte d'expression (en fait protéine tronquée mais pas détectée en IHC). BAP1 code une ubiquitine carboxyl hydrolase nucléaire qui est une enzyme de désubiquitination. Cette enzyme contient un domaine catalytique (UCH), et des domaines d'interactions dont un pour BRCA1 et BARD1 (BRCA1-associated RING domain protein 1) (ULD) avec lesquels il forme un complexe suppresseur de tumeur (Harbour et al. 2010). BAP1 montre des aspects régulateurs notamment dans la conformation de la chromatine (Machida et al. 2009;), et la réponse aux dommages à l'ADN par le biais de la recombinaison homologue (H. Yu et al. 2014), ou bien encore le cycle cellulaire (Misaghi et al. 2009) (Eletr & Wilkinson 2011).

Par séquençage de l'ADN génomique des tumeurs de classe 1 et de classe 2, Harbour et al ont découvert la présence de plusieurs mutations dans la région 3P21.1 correspondant au gène BAP1 dans plus de 80% des tumeurs de classe 2 (Tableau I.2). Peu de tumeurs de classe 1 porte des mutations dans ce gène. Toute classe confondue la fréquence d'apparition des mutations BAP1 dans les tumeurs de mélanome uvéal est de ~40% (Harbour et al. 2010). Les altérations de BAP1 peuvent donc être responsables de la tumorigenèse et du développement métastatique par la dérégulation de l'expression des gènes impliqués dans les processus cellulaires cités ci-dessus. En effet Harbour et al ont montré que diminuer l'expression de BAP1 par interférence ARN dans des cellules de mélanome uvéal 92.1, entraîne la dérégulation de l'expression de nombreux gènes. Sont observés notamment, la sous-expression de gènes de différenciation des mélanocytes (SOX10, CTNNb1, EDNRB) et la surexpression du gène CDH1 codant la E-cadhérine et du proto-oncogène c-Kit (Harbour et al. 2010).

Tableau I.2: Gènes drivers ou drivers potentiels mutés du mélanome uvéal. Classe 1A : classe de tumeurs de risque métastatique très faible à nul, classe 1B : classe de tumeurs de risque métastatique intermédiaire. Abbréviations : Chr: chromosome, p: bras court, q : bras long, PIP2: phosphatidylinositol4,5-bisphosphate; PIP3: phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate, Glu : Gutamine, Arg: Arginine, Asp : Acide aspartique, Leu : leucine. D'après les informations obtenues de (Amaro et al. 2017; Helgadottir 2016) (page suivante)

Gène muté	Localisation Chr	Fonction du gène	Fréquence de mutation	Caractéristiques	Type de mutation
GNAQ	9q21	Protéine G à activité GTPase: Médiation du signal entre les récepteurs transmembranaires couplés aux Protéines G et les protéines effectrices en aval. Activation constitutive de la voie MAPK	18 % – 53%	Incompatible avec GNA11, CYSLTR2 Et PLCB4 Evènement précoce. Pas de corrélation avec le pronostic	Mutations activatrices oncogéniques aux codons Glu209 ou Arg138 (plus rare)
GNA11	19p23	Protéine G à activité GTPase: Médiation du signal entre les récepteurs transmembranaires couplés aux Protéines G et les protéines effectrices en aval. Activation constitutive des voie MAPK	20% - 58%	Incompatible avec GNAQ, CYSLTR2 Et PLCB4 Evènement précoce Pas de corrélation avec le pronostic	Mutations activatrices oncogéniques aux codons Glu209 ou Arg138 (plus rare)
CYSLTR2	13q14	Récepteur transmembranaire couplé aux protéines G. Ligand = leucotriène Activation constitutive de la voie MAPK	3%	Incompatible avec GNAQ, GNA11, PLCB4 Pas de corrélation avec le pronostic	Mutation activatrice Leu129 →Gln
PLCB4	20p12	Protéine en aval des protéine G. Clivage du PIP2 en IP3 et DAG, stimulation de la protéine kinase C et activation de la voie MAPK transduction intracellulaire des signaux extracellulaires de la rétine.	4% - 9%	Incompatible avec GNAQ, GNA11, CYSLTR2 Pas de corrélation avec le pronostic	Mutation activatrice sur le codon Asp630
BAP1	3p21	Déubiquitine hydrolase: Gène suppresseur de tumeur Réponse des dommages à l'ADN prolifération	32% - 75%	Quasi-Incompatible avec SF3B1 et EIF1AX. Evènement tardif Associé au tumeurs de classe 2, à la monomie du chr 3, patients agés et au mauvais pronostic de survie	Mutations inactivatrices Souvent tronqué Gène hémizygote
SF3B1	2q33	Epissage des pré-ARNm	9% - 24%	Quasi-Incompatible avec BAP1 et EIF1AX. Associé à la disomie du chr, aux jeunes patients, développement tardif de métastases Corrélié à l'expression de PRAME Tumeurs de Classe 1B	Mutations hétérozygotes Mutation récurrente au sur le codon Arg625
EIF1AX	Xp22	Facteur d'initiation de la traduction eucaryote	8% – 21%	Quasi-Incompatible avec BAP1 et SF3B1. Associé à la disomie du chr 3, aux tumeurs de classe 1A et au bon pronostic de survie.	Mutations hétérozygotes dans l'exon 1 et 2

Mutation du gène SF3B1

Le gène SF3B1, localisé sur le chromosome 2, code la sous-unité 1 du complexe d'épissage 3B un composant essentiel de la machinerie épissage U2 (snRNPU2) et U12 (snRNPU12). Un autre aspect récemment découvert de SF3B1 l'identifie dans la réparation des dommages à l'ADN (te Raa GD et al 2015). 24% des tumeurs primaires de mélanome uvéal analysées par Onken et al porte une mutation prédominante de SF3B1 sur l'arginine 625 (R 625) de l'exon 4 (Decatur et al. 2016) (Tableau I.2). Les mutations faux-sens retrouvées dans des parties spécifiques du gène altèrent l'épissage de gènes cibles (Yoshida et al. 2011; Quesada et al. 2011). Cependant la conséquence de la mutation R625 sur le rôle de SF3B1 n'est pas claire mais ne semble pas liée à un défaut d'épissage (Harbour et al. 2013). La mutation SF3B1 est associée à un facteur de bon pronostic, aux patients d'âge jeune et à une disomie du chromosome 3. Une étude de suivi au long-terme a montré que les tumeurs avec une disomie du chromosome 3 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) (Yavuzigitoglu et al. 2016). Il serait donc plus juste d'associer le profil mutagène de SF3B1 à un risque métastatique intermédiaire et tardif. De plus, la présence de la mutation SF3B1 co-existe souvent avec l'expression de l'antigène PRAME (Field et al. 2016) (voir section 2.4.3). L'expression de PRAME est associée aux tumeurs de classe 1 qui métastasent, ce qui suggère l'existence d'un risque intermédiaire entre les tumeurs de haut risque caractérisées par BAP1 muté (classe 2) et ceux de faible risque caractérisée par la mutation EIF1AX (classe 1).

Mutations du gène EIF1AX

Le gène EIF1AX (Eukaryotic Translation Initiation Factor 1A) est localisé sur le chromosome X (Xp22). Entre 17 et 24% des tumeurs primaires de mélanome uvéal portent des mutations, pour la plupart, dans les exons 1 et 2 du gène (Decatur et al. 2016; Martin et al. 2013). Les mutations EIF1AX sont fréquentes dans les tumeurs non-métastatiques; elles sont associées aux tumeurs de classe 1 et à l'absence d'implication du corps ciliaire. Elles sont donc de bon pronostic (Decatur et al. 2016). Dans ce sens, sur 24 des 81 tumeurs analysées par Harbour et al qui ont métastasé, aucune ne présentait de mutations EIF1AX. De plus, ces mutations sont souvent identifiées dans les tumeurs avec une disomie du 3 (48%) et rares dans les cas de monosomie (3%) (Martin et al. 2013). La majorité des mutations retrouvées sont des mutations faux-sens menant à des substitutions ou courtes délétions d'un ou deux acides aminés. Une des nouvelles mutations identifiées conduit à la formation d'un variant d'épissage (Decatur et al. 2016; Harbour et al. 2010). EIF1AX code un facteur d'initiation à la traduction eucaryote. Ce facteur permet l'initiation de la traduction par le transfert de l'ARNt –mét initiateur sur la petite sous-unité ribosomal 40S. La conséquence des mutations EIF1AX pour son rôle dans le mélanome uvéal n'est pas claire. Cependant nous pouvons écarter l'éventualité d'un défaut d'ancrage à l'ARN puisque la totalité des mutations retrouvées sont dans la partie aminoterminal de la protéine et n'affecte pas sa zone d'interaction à l'ARN (Battiste et al. 2000).

Pour conclure, un modèle de progression du développement du mélanome uvéal a été proposé sur la base des altérations génomiques décrites ci-dessus et est présenté dans la figure I.11. Il place les mutations activatrices GNAQ/GNA11, CYSLTR2 et PLCB4 comme des événements précoces à l'initiation de la tumeur, les mutations BAP1 comme tardives et prédictives des tumeurs de classe 2 qui métastasent. Et les mutations SF3B1 et EIF1AX, qui sont quasi-incompatibles avec les mutations BAP1 et elles-mêmes indépendantes l'une de l'autre sont associées aux tumeurs de classe 1 à risque métastatique intermédiaire et faible respectivement. La gène PTP4A3/PRL-3 qui code la protéine d'intérêt du laboratoire a été placé dans le schéma et sera décrit dans la section suivante et dans la partie II.

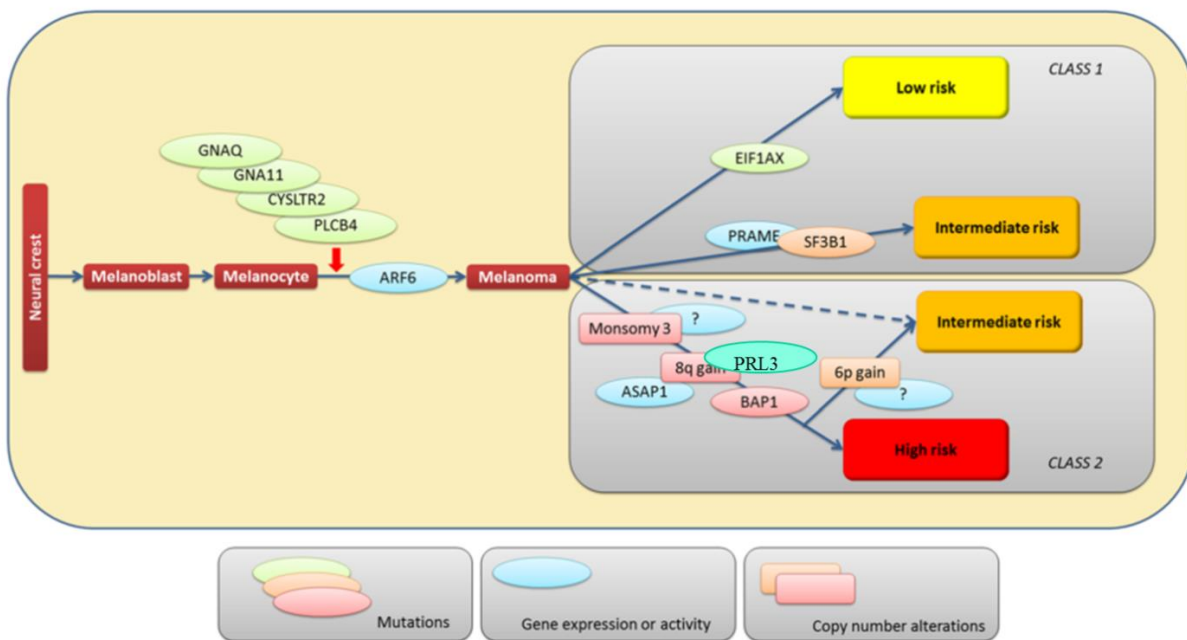


Figure I.11: Modèle de progression de la tumorigénèse du mélanome uvéal. Le schéma développe une hypothèse de la tumorigénèse du mélanome uvéal basée sur les connaissances actuelles des anomalies moléculaires. Le mélanome uvéal se développe par la transformation des mélanoblastes ou mélanocytes puis 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 adaptées de (Amaro et al. 2017).

2.4.3. Surexpression de gènes corrélée avec la progression du mélanome uvéal : CCDN1- NBS1 - Synténine - DDEF1 - PRL-3...

Les mutations ne sont pas les seules modifications qui affectent les gènes dans les cancers. La modulation de l'expression des gènes est un phénomène commun dans le mélanome uvéal, et plus généralement dans les cancers. La surexpression de certains de ces gènes est parfois corrélée à la progression métastatique et au développement métastatique.

Dans 67 à 100% des tumeurs de mélanome uvéal, la protéine anti-apoptotique Bcl-2 est reportée comme surexprimée. Cette surexpression empêcherait l'apoptose mais ne semblerait pas corrélée à la survie des patients (Jay et al. 1996; Chana et al. 1999) .

Une surexpression du gène codant la cycline D1 (CCND1) (12q5) est observée dans 65% des tumeurs de mélanome uvéal. Cette surexpression résulterait en l'activation des CDKs (cyclin dépendant kinases), qui aurait pour conséquence l'inactivation par phosphorylation de Rb (Coupland et al. 1998; Coupland et al. 2000). La surexpression de CCND1 corrèle avec les tumeurs de grande taille, les cellules épithélioïdes et un mauvais pronostic (Coupland et al. 2000).

NBS1 (Nijmegen breakage syndrome 1) est un gène dont la surexpression dans 50% des tumeurs de mélanome uvéal corrèle avec l'agressivité tumorale et métastatique (Ehlers & Harbour 2005). Le gène code une protéine contribuant au mécanisme de réparation des cassures doubles brins. Ehlers et al suggèrent que la surexpression de NBS1 permettrait la progression du mélanome uvéal en stimulant la réparation des dommages à l'ADN, dont l'accumulation est fréquente dans les tumeurs de stade avancé ayant une importante instabilité génomique.

Récemment, l'antigène PRAME (preferentially expressed antigen in melanoma) a été proposé comme biomarqueur indépendant pour le mélanome uvéal. L'expression de l'ARNm PRAME combinée aux 12 gènes signatures définis par Harbour (Onken et al. 2010)(Onken et al, 2010) prédit le développement de métastases dans 38% des tumeurs de classe 1 et 78% dans les tumeurs de classe 2 comparées. Aucune des tumeurs de classe 1 qui n'exprimaient pas PRAME n'a développé des métastases. Le rôle de l'expression de PRAME dans le mélanome uvéal n'est pas encore défini mais des études sont en cours. (Field et al. 2016). (Figure I.11).

Le gène DDEF1/ASAP1 (Development and differentiation enhancing factor 1), proposé comme oncogène, est localisé en 8q24.21 et est révélé surexprimé dans les tumeurs de mélanome uvéal de classe 2 (Ehlers et al. 2005). Ehlers et al ont montré que la surexpression de DDEF1 dans des cellules de mélanome uvéal Mel202 favorisait la migration et pourrait, de ce fait, être important pour le développement métastatique. DDEF1 est une protéine qui stimule l'activité GTPase des protéines G (GTPase activating protein) et interagit avec des protéines effectrices de signaux de transduction telles que Src, FAK, PIP2 et Crk. Cette protéine régule le remodelage du cytosquelette d'actine qui est nécessaire à la migration cellulaire. Par sa localisation au niveau des points focaux permettant l'adhérence de la cellule à la matrice extracellulaire, DDEF1 perturberait la formation des plaques d'adhérence au front de migration de la cellule, empêcherait l'adhérence cellulaire et par conséquence

favoriserait la migration des cellules. (La migration cellulaire et les plaques d'adhérence focale seront développées dans le chapitre III) (Ehlers et al. 2005).

La synténine, est une autre protéine de l'adhérence dont le rôle a été décrit dans la promotion du processus métastatique du mélanome uvéal (Gangemi et al. 2012), ainsi que celui du mélanome cutané. Elle est codée par le gène SDCBP (syndecan binding protein) localisé sur le chromosome 8 (8q12). La synténine, initialement connue sous le nom de mda-9 (melanoma differentiation-associated protein 9) est exprimée à des niveaux élevés dans les stades avancés de mélanome cutané contrairement aux naevi bénins et aux tumeurs primaires (Helmke et al. 2004). La surexpression de la synténine induit l'activation de la voie MAPK/NFKB par son interaction avec les kinases c-Src et FAK (Boukerche et al. 2008) ; ce qui conduit à l'induction de l'expression de gènes impliqués dans la migration et l'invasion cellulaire. Dans le mélanome uvéal, les taux élevés d'expression de la synténine se sont révélés être significativement associés à une progression métastatique précoce, et corrélés avec le risque métastatique, et ceci aussi fortement qu'avec la monosomie du chromosome 3. De plus, les métastases hépatiques présentent une expression de la synténine plus importante que dans les tumeurs primaires (Gangemi et al. 2012). Les auteurs montrent également que l'inhibition de l'expression de la synténine diminue l'activation des kinases Src, FAK et AKT. Src étant la kinase activant la cascade de signalisation ERK1/2 impliquée dans la tumorigénèse du mélanome uvéal (Zuidervaart et al. 2005). L'inhibition de Src dans des cellules de mélanome uvéal en culture, monosomiques sur le chromosome 3 et mutées pour GNAQ/GNA11, inhibe la MAPK et induit l'arrêt de la croissance cellulaire (Versluis et al. 2011). La synténine pourrait donc être un élément important dans la formation et la dissémination métastatique du mélanome uvéal.

L'expression d'une autre protéine de l'adhérence cellulaire a été évaluée et corrélée aux caractéristiques clinocopathologiques et au devenir des patients atteints de mélanome uvéal. Il s'agit de l'eitrine. Une première étude décrit l'eitrine comme un indicateur pronostic en corrélation avec les caractéristiques du mélanome métastatique (Mäkitie et al. 2001) et la mortalité des patients. Cependant dans une autre étude où l'eitrine est exprimée dans 50% des tumeurs, Mallikarjuna et al n'observent aucune relation entre son niveau d'expression et la survie des patients avec métastases (Mallikarjuna et al. 2013).

Notre groupe a mis en évidence le haut taux d'expression du gène codant la phosphatase PRL-3 dans les tumeurs de mélanome uvéal qui métastasent. 28 tumeurs primaires issues de patients ayant développées des métastases dans les trois ans suivant l'énucléation (méta1 - classe 2) ont été comparées à 29 tumeurs issues de patients n'ayant pas développé de métastases dans le même intervalle de temps (méta0 - classe 1). Sur un total de 983 gènes différentiellement exprimés entre les tumeurs méta 0 (classe 1) et méta 1 (classe 2), le gène PTP4A3/PRL-3 localisé dans la région 8q21 apparait comme le gène le plus significativement différentiel entre ces deux groupes de tumeurs ($p < 10^{-5}$) et dont la surexpression est fortement prédictive de la survie des patients et du développement métastatique (Laurent et al. 2011) (Figure I.12). Cependant cette surexpression n'est pas que de valeur pronostique des métastases mais a certainement un rôle causal dans le processus métastatique (voir partie IV) (Laurent et al. 2011). La partie II sera consacrée à l'étude des membres de la famille des PRLs et leur implication dans les cancers.

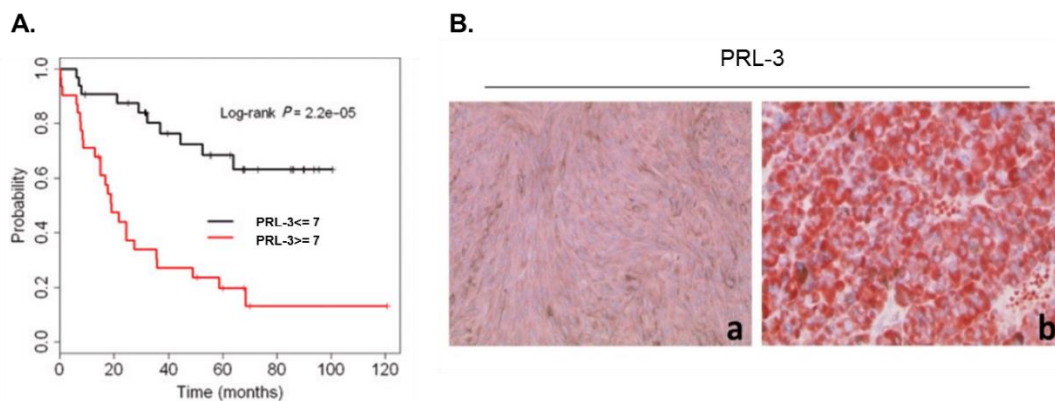


Figure 1.12: Expression de PRL-3 dans les tumeurs de mélanome uvéal. (A) Courbe de survie Kaplan Meier en fonction du niveau d'expression de l'ARNm de PRL-3. Les patients surexprimant la phosphatase PRL-3 ($PRL-3 > 7$) ont une probabilité de survie plus faible à 3 ans après énucléation que les patients ne la surexprimant pas ($PRL-3 < 7$). 7 est une valeur seuil qui a été définie par les bioinformaticiens de l'institut Curie. (B) Exemple de détection de la protéine PRL-3 par immunohistochimie sur une coupe de tumeur de patients méta 0 avec une faible expression de la protéine (image a) et méta 1 correspondant à une forte expression (image b). Image et légende adaptée de Laurent et al 2011.

2.4.4. Altérations d'expression de récepteurs et tropisme hépatique des métastases du mélanome uvéal

Le mélanome uvéal présente une dissémination hématogène qui semble favoriser l'envahissement métastatique du foie. Ce tropisme préférentiel pourrait impliquer l'expression des récepteurs aux facteurs de croissance HGF et IGF1 ainsi que celui aux chimiokines à la surface des cellules de mélanome uvéal métastatiques.

Le facteur de croissance des l'hépatocytes (HGF, Hepatocyte growth factor) et son récepteur spécifique c-met, un récepteur à tyrosine kinase, ont un rôle spécifique dans l'embryogénèse du foie et sa régénération à l'âge adulte en contrôlant spécifiquement la croissance des cellules hépatiques (Furge et al. 2000; Yan et al. 2009). En réponse à la fixation de son ligand, l'HGF, c-met s'active par autophosphorylation sur deux résidus tyrosines. Ceci induit la formation de sites de fixation pour des protéines adaptatrices des signaux de transduction telles que Grb2 (Growth factor receptor-bound protein 2), la PI3K, Shc et Src, qui stimulent de multiples voies de signalisation (Furge et al. 2000; Peruzzi & Bottaro 2006). C-Met agit comme un facteur mitogène pour les mélanocytes et son expression dans les tumeurs de mélanome uvéal augmente significativement le risque de développer des métastases hépatiques (Mallikarjuna et al. 2013).

L'activation de l'IGF1R semble impliquée dans l'adhérence, la migration, l'invasion et l'apoptose (Riedmann J et al 2006). L'activation, suite à la fixation du ligand IGF1, induit l'activation de son activité tyrosine kinase puis conduit à la phosphorylation des IRS (insuline receptor substrate). Les IRS phosphorylées interagissent avec des protéines à domaine SH2 et induisent l'activation des voies de signalisation PI3K et MAPK (Zhang et al. 2004). Le récepteur IGF1R est exprimé dans les tumeurs primaires de mélanome uvéal (Rodeck et al. 1991). Des études d'inhibition de ce récepteur montrent une diminution spécifique de la prolifération et de la survie des cellules de mélanome uvéal (All-Ericsson et al. 2002; Girnita et al. 2008). De même, l'inhibition de l'IGF1R avec un inhibiteur spécifique, la picropodophylline cause une régression tumorale dans un modèle murin de xénogreffe de mélanome uvéal (Girnita et al. 2004). La signalisation médiée par l'axe IGF1 /IGFR1 n'est pas uniquement impliquée dans la prolifération des cellules de mélanome uvéal. En effet des études ont suggéré l'implication de la surexpression du récepteur dans le développement métastatique ; d'une part en augmentant probablement l'affinité des cellules tumorales pour le foie, site où est exprimé l'IGF1 (Economou et al. 2005), et d'autre part en contrôlant l'activation d'Akt dont l'augmentation de la phosphorylation est reportée dans les métastases de patients de mélanome uvéal (Saltiel & Kahn 2001).

L'expression du récepteur aux chimiokines CXCR4 à la surface des cellules tumorales est un marqueur de mauvais pronostic (Di Cesare et al. 2007; Scala et al. 2007). L'activation de CXCR4 par l'un de ces ligands CXCL12 entraîne la transduction d'une grande variété de signaux intracellulaires de la survie, prolifération, migration et adhérence (Yasumoto et al. 2006). L'une des voies affectées dans les cellules de carcinomes gastriques NUGC4 est la voie PI3K dont le niveau de phosphorylation d'AKT est élevée (Yasumoto et al. 2006). Comme mentionné précédemment, un niveau de phosphorylation élevé d'AKT est retrouvé dans les tumeurs de mélanome uvéal de mauvais pronostic (Saraiva et al. 2005) et joue un rôle aussi bien dans la prolifération que dans la migration cellulaire, qui est un mécanisme essentiel à la dissémination métastatique. 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 (Li et al. 2009). 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.

2.5. Développement de thérapies systémiques conventionnelles et ciblées pour le mélanome uvéal métastatique

Comme nous l'avons évoqué précédemment en dépit d'un traitement efficace de la tumeur primaire et des efforts d'une surveillance active, 50% des patients atteints par le mélanome uvéal présentent une dissémination métastatique par voie hématogène, affectant principalement le foie, il n'existe pas encore de soins standardisés pour le traitement de ces patients ; et aucune thérapie systémique n'a encore démontré de résultats efficaces sur le devenir des patients afin d'être mise sur le marché.

Néanmoins et malgré les différences moléculaires existantes entre le mélanome cutané et le mélanome uvéal, des essais de traitements par chimiothérapies et immunothérapies ont été tentés sur la base des succès observés dans le mélanome cutané. Les résultats obtenus sur la survie globale des patients, ainsi que sur la survie sans progression (SSP) avec les différents agents chimiothérapeutiques cytotoxiques testés (dacarbazine, temozoline, cisplatine, treosulfan, fotemustine....) sont décevants. Dans ce même sens, les essais réalisés avec des anticorps monoclonaux humains ciblant soit le récepteur CTLA-4 (ipilimumab) soit le récepteur PD-1 (Nivolumab et Pembrolizumab), ont une activité clinique limitée dans le mélanome uvéal avec une survie sans progression d'environ 3 mois (Carvajal et al. 2016). D'autres essais de traitements basés sur la réponse immunitaire sont en cours et incluent des études sur les lymphocytes infiltrants. Tel est le cas avec l'agent immuthérapeutique bi-spécifique, IMCgp100, qui cible à la fois la protéine mélanocytaire gp100 et le complexe protéique CD3 exprimé à la surface des lymphocytes T. IMCgp100 augmente l'affinité et l'activation des lymphocytes T CD8+ contre les cellules tumorales exprimant le peptide gp100. Les premiers résultats de la phase I présentés en 2016 montrent un profil de survie favorable et une réduction tumorale dans les patients atteints de mélanome uvéal métastatique (Benjamin A Krantz, Nikita Dave, Kimberly M Komatsubara & Carvajal 2017).

En raison de la résistance des tumeurs de mélanome uvéal aux traitements chimiothérapeutiques conventionnels, il devient urgent de développer des traitements ciblés et efficaces afin de traiter les métastases et d'améliorer la survie des patients dont la prise en charge actuelle de la maladie est difficile.

Grâce au développement des techniques de séquençage qui ont permis une meilleure compréhension des bases moléculaires menant au développement et à la progression du mélanome uvéal, de nombreuses cibles potentielles pour le traitement du mélanome uvéal métastatique ont été révélées. Plusieurs thérapies sont en cours d'investigation et incluent des inhibiteurs de :

- La voie de signalisation MAPK (au niveau de MEK et PKC)
- La voie de signalisation PI3K/AKT (au niveau de AKT)
- mTOR
- mTOR combiné à IGF1R
- Récepteurs à tyrosine kinase : c-Met et c-Kit
- HDAC (histone désacétylase)

Compte tenu de l'importance de la voie MAPK dans le MU, plusieurs inhibiteurs de MEK $\frac{1}{2}$ sont investigués comme thérapies du mélanome uvéal, et incluent TAK733 et les Sunitinib, selumetinib, trametinib. Le selumetinib, en essai de clinique de phase II, montre une efficacité dans le devenir des patients avec une survie sans progression de la maladie améliorée de 9 semaines en comparaison aux patients qui ont été traités par chimiothérapie systémique (SSP 15.9 semaines vs 7 semaines). En revanche, dans un autre test aucun effet significatif n'est observé sur la survie globale des patients. En raison des résultats contradictoires, des essais concernant le selumetinib sont toujours en cours d'évaluation. Les résultats de phase I obtenus avec le trametinib sont moins convaincants que ceux du selumetinib puisque la médiane de survie sans progression de la maladie est uniquement de 1.8 mois. L'inhibition de MEK par deux autres inhibiteurs, TAK733 et le sunitinib ont montré une diminution de la prolifération *in vitro* et *in vivo* (von Euw et al. 2012; Mahipal et al. 2012; Carvajal et al. 2016). Le sorafenib est un inhibiteur multikinase dont l'efficacité sur la croissance tumorale a été démontré dans le cas du 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. Les résultats de la phase II investiguant les effets d'une monothérapie de sorafenib chez des patients atteints d'un mélanome uvéal métastatique montrent une amélioration de la survie sans progression de la maladie à 24 mois dans 31% des patients, mais aucun effet significatif sur la survie globale (Mouriaux et al. 2016). Le bilan des essais cliniques investiguant les effets des inhibiteurs de kinases montrent des résultats décevants puisqu'ils n'améliorent pas la survie globale des patients atteints de mélanome uvéal métastatique.

La phosphorylation représentative de l'activation d'AKT est observée dans plus de 50% des mélanomes uvéaux et est associée à un risque élevé de métastases (Saraiva et al. 2005). La bithérapie selumetinib et MK2206 (un autre inhibiteur d'AKT) ont induit une diminution de la viabilité de multiples lignées cellulaires de mélanome uvéal et le volume tumoral sur des modèles murins de xénogreffes. Ces résultats laissent envisager qu'une combinaison est efficace entre des inhibiteurs de MEK et AKT. Des essais cliniques de phase II sont en cours afin d'évaluer l'efficacité du trametinib seul ou en combinaison avec un inhibiteur de AKT (GSK2141795) dans des patients touchés par un mélanome uvéal métastatique (Carvajal et al. 2016).

PKC est une autre protéine de la voie MAPK qui est dérégulée en aval des protéines G α . Des expériences réalisées *in vitro* ont montré des effets synergiques entre un inhibiteur de PKC et de MEK sur la prolifération et l'induction de l'apoptose. Cette combinaison induit également une réduction du volume tumoral dans un modèle de xénogrefe murin de mélanome uvéal muté dans GNAQ (Chen et al. 2013). Un groupe de l'Institut Curie a investigué, sur des modèles murins de xénogreffes de mélanome uvéal, un large panel de différentes combinaisons possibles entre un inhibiteur de PKC AEB071 et plusieurs autres types d'inhibiteur. 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 (Carita et al. 2016).

Le crizotinib est un inhibiteur de c-Met, ALK et Ros 1 dont l'activité affecte la phosphorylation de c-Met dans le mélanome uvéal, mais pas celles de ALK et Ros 1 (Benjamin A Krantz, Nikita Dave, Kimberly M Komatsubara & Carvajal 2017). Une étude réalisée sur des modèles murins de mélanome uvéal montre une inhibition de l'établissement métastatique sous traitement au crizotinib. Crizotinib est une molécule à effet thérapeutique potentiel utilisé comme adjuvant du mélanome uvéal. Des études sont en cours.

Une autre piste importante pour le traitement des mélanomes uvéaux métastatiques est l'inhibition de la régulation épigénétique dans ces tumeurs. BAP1 est un gène muté dans 80% des mélanomes uvéaux métastatiques dont l'une des fonctions est la désubiquitination de l'histone H2A. L'absence d'un BAP1 fonctionnel mène à l'hyperubiquitination de H2A et par conséquent à une répression de l'activité transcriptionnelle. L'inhibition de l'histone déacétylase (HDAC) contrecarre cet effet, favorise la différenciation cellulaire et induit une transition, passant d'un profil d'expression de la classe 2 vers un profil d'expression associé à la classe 1 dans des cellules en culture de mélanome uvéal.

Cette liste de molécules à effets thérapeutiques ciblés, est une liste non-exhaustive des traitements actuellement testés dans la pathologie du mélanome uvéal métastatique. A ce jour, ClinicalTrials.gov référence 135 essais sur le mélanome uvéal.

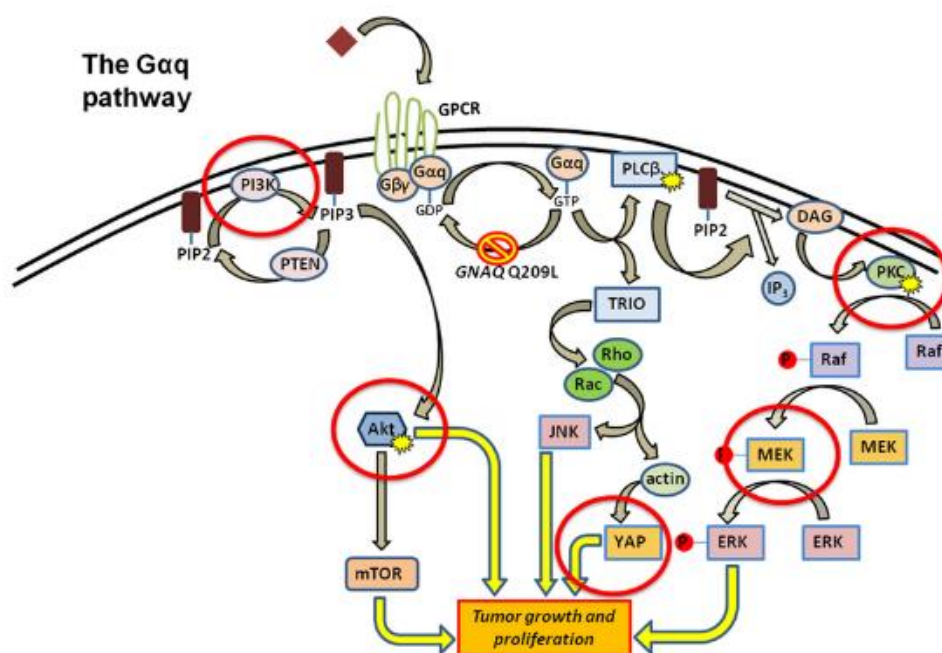


Figure 1.13 : Stratégies thérapeutiques du mélanome uvéal. Les kinases MEK et PKC sont des cibles thérapeutiques majeures identifiées en aval des mutations GNAQ/GNA11. Les voies PI3K/AKT et Rho/Rac/YAP sont également des pistes envisageables. Figure et légende adaptées de (Luke et al. 2014).

Comme nous venons de le voir , nous avons trouvé le gène codant la phosphatase PRL-3 surexprimée dans le mélanome uvéal et cette surexpression est hautement prédictive du risque métastatique (Laurent et al. 2011). Depuis cette découverte dans le contexte du mélanome uvéal, PRL-3 est devenu le centre d'investigation principal de notre laboratoire ; et la partie II sera consacrée à sa présentation ainsi qu'à celle des deux autres membres de la sous-famille à laquelle elle appartient (Laurent et al. 2011).

PARTIE II : PRLs, PRL-3/PTP4A3 et cancers

La phosphorylation et la déphosphorylation sont des modifications post-traductionnelles qui ont des rôles clés dans la régulation des processus cellulaires. Ces modifications sont fondamentales dans la transduction des signaux de nombreuses voies de signalisation. Une régulation anormale de ces processus, basée sur une hyperphosphorylation-le plus souvent- ou une déphosphorylation abusive, est produite dans les cancers. Cette dynamique de phosphorylation est contrôlée par deux types d'enzymes : les kinases et les phosphatases. Le rôle des kinases, en situation physiologique et dans les cancers est bien défini. Nombreuses sont celles qui sont identifiées comme des oncogènes quand elles sont dérégulées. Par son rôle antagoniste à celui des kinases, les phosphatases sont traditionnellement assimilées à la fonction suppresseur de tumeur. Cependant cette simplification ne s'applique pas toujours. Plusieurs phosphatases dérégulées dans les cancers, ont été identifiées comme oncogène. C'est notamment le cas de la protéine PRL-3 qui semble à la fois impliquée dans la croissance de la tumeur primaire et dans le processus métastatique de nombreux cancers.

1. La famille des PRLs : membre des protéines tyrosine phosphatases

Les Protéines tyrosines phosphatases (PTPs) forment l'une des deux familles de protéines phosphatases qui sont classifiées selon la spécificité de leurs substrats et leur mécanisme. L'autre famille étant les protéines sérine/thréonine phosphatases. Les PTPs sont sous-divisées en PTPs classiques et en phosphatases à double spécificité (PDS). Alors que les PTPs classiques déphosphorylent uniquement les phosphotyrosines, les PDSs reconnaissent également les phosphosérine, phosphothréonines, les phospholipides, les ARN et le glycogène (Alonso et al. 2004; Bessette et al. 2008). Les PTPs jouent un rôle crucial dans la régulation de voies de signalisation impliquées dans le contrôle de la différenciation cellulaire, la prolifération, l'adhérence, la migration, la survie ou encore l'apoptose (Alonso et al. 2004). La dérégulation de l'activité des PTPs a été identifiée et impliquée dans la progression de diverses pathologies incluant entre autres le cancer (Östman et al. 2006). C'est notamment le cas des PTP4A/PRL (Protein Tyrosine Phosphatase 4A/Protein of Regenerating Liver), sous-famille des PTP, qui sont depuis plusieurs années mises en cause dans la progression de plusieurs cancers (Bessette et al. 2008).

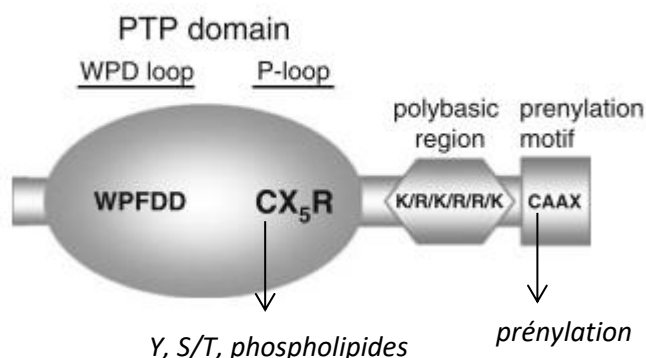


Figure II.15: Représentation schématique des phosphatases PRLs. PRL-1 PRL-2 et PRL-3 partagent des domaines structuraux homologues. Le domaine catalytique ou domaine PTP est responsable de l'activité enzymatique et requiert le site actif CX5R (boucle-P) ainsi que les résidus de la boucle WPD (aspartate (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 (PRL-1: CCIQ; PRL-2: CCVQ; PRL-3: CCVM). C : cystéine ; A : résidu aliphatique et X : tout acide aminé. Abréviations : Y : tyrosine, S/T : sérine/thréonine. Figure et légende d'après (Bessette et al. 2007)

1.1.2. Structure tridimensionnelle des PRLs et apport pour la compréhension de leur activité catalytique

La structure cristalline des trois PRLs a été résolue par résonance nucléaire magnétique (Kozlov et al. 2004; Kim et al. 2004; Sun et al. 2005; Jeong et al. 2005; Laurence et al. 2004; Zhou et al. 2003). La structure de PRL-1 a également été obtenue par cristallographie avec une résolution de 2,7 Å ce qui correspond à une bonne résolution des repliements de la protéine (Jeong et al. 2005). Ces découvertes révèlent, en cohérence avec leur homologie de séquence protéique qu'elles ont des structures similaires, avec une plus grande similitude entre PRL-1 et PRL-3.

Dans l'ensemble les PRLs ont une homologie de structure proche des phosphatases à double spécificité PTEN, VHR/DUSP3 (Dual specificity protein phosphatase 3), CDC14 et KAP (Kinase-Associated Phosphatase) (Kozlov et al. 2004; Jeong et al. 2005). Les structures des PRLs révèlent une poche catalytique hydrophobe peu profonde, ce qui leur permet d'accueillir cette grande variété de substrats. Que les substrats soient dotés de chaînes latérales courtes dans le cas de phosphosérine et phosphothréonine ou de chaînes latérales longues pour les phosphotyrosine, les résidus présentés pourront être déphosphorylés par la cystéine active localisée à la base de la poche (Jeong et al. 2005; Sun et al. 2005; Kozlov et al. 2004; Kim et al. 2004). L'entrée de cette dernière est en revanche plus large que celle habituellement retrouvée dans les PDSs, ce qui peut expliquer la capacité des PRLs à s'accommoder à un large choix de substrats. De manière semblable aux PTPs, les PRLs présentent dans leur domaine catalytique une boucle WPD (WPD loop) ainsi qu'une boucle P (P loop) (motif

CX5R), essentielles au mécanisme de catalyse utilisé par cette super-famille d'enzymes (Liang, Kumar, et al. 2007).

La déphosphorylation des protéines par les PTPs implique l'insertion de la chaîne latérale portant le phosphorésidu dans la poche catalytique et un procédé de catalyse covalente impliquant le résidu cystéine du site actif. La figure II.16 schématise les étapes de la catalyse. La cystéine catalytique (du motif CX5R) réalise une attaque nucléophile du substrat qui entraîne la formation d'un état intermédiaire de l'enzyme (thiophosphorylée) et la libération du substrat déphosphorylé. Ce transfert de phosphate est assisté par l'acide aspartique conservé de la WSP loop qui protone le groupement phosphate du phosphorésidu de la protéine. La seconde étape consiste en l'hydrolyse du phosphoenzyme intermédiaire par une attaque nucléophile impliquant une molécule d'eau et le même acide aspartique, qui cette fois fonctionne comme une base. La glutamine conservée (Gln262 de PTP1B, cf Figure II.16) est importante pour le placement de la molécule d'eau nucléophile lors de l'hydrolyse du phosphoenzyme. L'arginine du motif CX5R permet la fixation du substrat et la stabilisation à l'état intermédiaire (Liang, Kumar, et al. 2007).

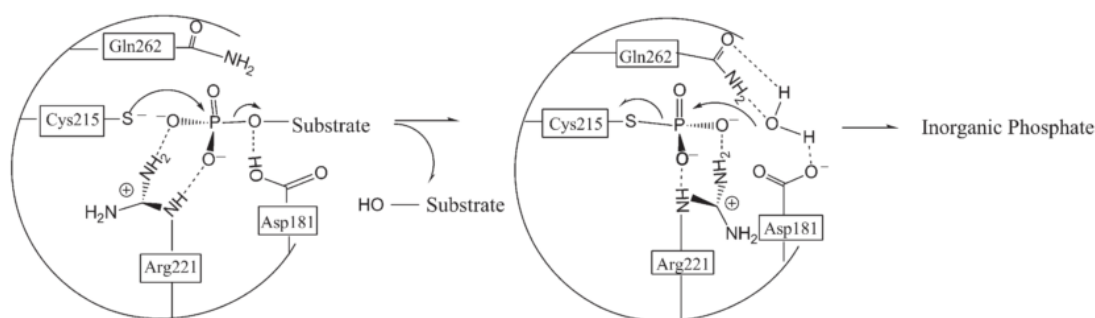


Figure II.16 : Mécanisme chimique de la réaction de déphosphorylation par une phosphatase à double spécificité. Mécanisme de la phosphatase PTP1B. La cystéine du site catalytique C215 de PTP1B est en position 104 pour PRL-1 et PRL-3 et C101 pour PRL-2, elle réalise une attaque nucléophile du substrat. L'acide aspartique (Asp) conservé de la WSP loop protone le phosphoenzyme formé à la suite de la l'attaque nucléophile. La glutamine est essentielle à l'hydrolyse du phosphoenzyme. L'arginine de la P-loop (CX5R) est ici l'arginine 221 qui aide à la fixation du substrat dans la poche catalytique et à la stabilisation du phosphoenzyme à l'état intermédiaire. Figure issue de (Liang, Kumar, et al. 2007)

Bien que les PRLs possèdent ces deux boucles centrales au mécanisme de catalyse des PTPs, des différences significatives existent, et pourraient affecter leur activité et leur spécificité (Kozlov et al. 2004; Jeong et al. 2005). A titre d'exemple la nature des résidus X5 de la P loop de PRL-1 et PRL-3 est nettement plus hydrophobe que celle des autres PDS telles que PTEN et VHR qui ont un site actif riche en résidus polaires (Kozlov et al. 2004; Jeong et al. 2005). Les PRLs contiennent une alanine à la place du résidu sérine/thréonine conservé entre les PTPs qui est juxtaposé à l'arginine du motif CX5R (Sun et al. 2005; Kozlov et al. 2004). Cette modification résulte en une diminution de l'activité intrinsèque des PRLs *in vitro*, en raison du rôle de cette sérine/thréonine dans la libération du phosphate de la phosphoenzyme durant le mécanisme catalytique (Burke & Zhang 1998). En ce sens, il a été montré

que la mutation de cette alanine en sérine améliore la déphosphorylation de substrats non-naturels des PRLs tels que para-nitrophenyl phosphate (pNPP) et ortho-méthylfluoresceine phosphatate (OMFP) (Sun et al. 2005; Kozlov et al. 2004; McParland et al. 2011). La mutation de l'alanine en sérine dans PRL-3 abolit de manière surprenante l'activité phosphatase envers des phosphoinositides (McParland et al. 2011). En résumé le rôle de cette sérine ou alanine n'est pas clair, mais semble différent en fonction des phosphatases ; Il est par ailleurs suggéré que ce résidu soit impliqué dans la reconnaissance du substrat ou dans l'intégrité de la structure (McParland et al. 2011).

Les structures des PRLs ont également permis de découvrir deux types d'interaction qui semblent affecter l'activité catalytique de ces enzymes. D'une part, la cristallisation de PRL-1 a montré qu'il forme des trimères et qu'il est apte à former des dimères et des oligomères *in vivo* (Jeong et al. 2005; Sun et al. 2005). Cette trimérisation semble essentielle aux fonctions pro-migratoires et pro-prolifératives de PRL-1 dans des cellules HEK293. L'oligomérisation des monomères de PRL-1 implique des résidus conservés entre les PRLs, ce qui confirme le fait qu'une forme recombinante de PRL-3 soit également capable de former des dimères et de trimères détectables *in vivo* (Sun et al. 2007). Par ailleurs, les PRLs possèdent une cystéine conservée (cystéine 49 : PRL-1 et PRL-3 et cystéine 46 pour PRL-2) suffisamment proche structurellement de la cystéine catalytique (cystéine 104 : PRL-1 et PRL-3 et cystéine 101 : PRL-2) pour pouvoir former un pont disulfure réversible qui inhiberait leur activité catalytique intrinsèque. Les auteurs de ces études suggèrent donc que les PRLs pourraient être inactivées par oxydation (Kozlov et al. 2004; Jeong et al. 2005).

1.1.3. Localisation subcellulaire des PRLs et implication de la prénylation

a) La prénylation

Le motif CAAX est un motif de prénylation commun aux protéines qui sont associées aux membranes (Winter-Vann & Casey 2005). Les motifs de prénylation sont des séquences térapeptidiques qui, outre CAAX, suivent un enchainement d'acides aminés lambda (X) et de cystéines (C) selon les modèles suivants XXCC, XCXC et CCXX. La prénylation est une modification post-traductionnelle qui consiste en l'ajout, par liaison covalente, d'un groupement lipidique isoprénoïde sur le résidu cystéine du motif CAAX dans la partie carboxyterminale de la protéine. La reconnaissance de ces motifs par une farnésyltransférase ou une géranylgeranyltransférase, permet l'adressage de nombreuses protéines aux sites membranaires appropriés dans la cellule autorisant ainsi leur participation dans la transduction des signaux des voies auxquelles elles appartiennent. La différence entre ces deux enzymes réside dans la taille de la chaîne lipidique qu'elle lie à la cystéine et dans la nature des résidus X: la farnésyltransférase attache un lipide isoprénoïde composé de 15 carbones, et préfère des méthionines et sérines en position X tandis que la géranylgeranyltransférase attache une chaîne de 20 carbones et a plus d'affinité pour les leucines en X (Seabra et al. 1992; Andres et al. 1993; Wang & Casey 2016). Suite à l'ajout du groupement lipidique sur la cystéine du motif CAAX, les protéines sont clivées entre la cystéine et l'alanine de ce motif par une enzyme accrochée à la surface cytoplasmique au réticulum endoplasmique, nommée RCE1 (RAS-converting CAAX endopeptidase 1). S'ensuit une

carboxyméthylation de la protéine par l'ICMT (isoprenylcysteine carboxylmethyltransferase) qui induira son trafic vers une destination membranaire (Wang & Casey 2016).

PRL-1 et PRL-2 peuvent être farnésylées ou géranylgeranylées. En ce qui concerne PRL-3, elle est farnésylée mais sa géranylgeranylation, bien qu'effective *in vitro*, n'a pas été mise en évidence *in vivo* (Cates et al. 1996; Zeng et al. 2000). Les protéines à motif CAAX sont largement impliquées dans les fonctions cellulaires telles que la différenciation, la prolifération, et la tumorigénèse. Les protéines Ras incluant H-Ras, K-Ras et N-Ras sont farnésylées, et adressées à la membrane plasmique ou à l'appareil de Golgi, où elles opèrent dans la voie des MAPK, pour la transduction de signaux pro-prolifératifs, et dans les cancers où ils participent à la prolifération tumorale. De même Rho-A, Rho-B, Rho-C, sont localisées à la membrane plasmique à la suite d'une géranylgeranylation et résulte dans la promotion de l'angiogenèse, de la prolifération et de l'invasion métastatique (Winter-Vann & Casey 2005; Michaelson et al. 2001). Des inhibiteurs de la farnésyltransférase (FTase) et la géranylgeranyltransférase (GGTase) ont été développés et sont utilisés en études *in vitro*.

b) Localisation subcellulaire des PRLs

En raison du faible taux d'expression des PRLs dans les cellules normales des différents tissus humains (section 1.2), la majeure partie des études se rapportant à la localisation subcellulaire des PRLs sont réalisées sur des modèles de cellules cancéreuses ou immortalisées.

Les protéines phosphatases PRLs sont localisées aux membranes lipidiques. Elles sont retrouvées à la membrane plasmique, dans les autophagosomes, à la surface des endosomes précoces, et une faible fraction de protéines non farnésylées est toutefois localisée dans le noyau et soluble dans le cytoplasme dans certains types cellulaires. (Cates et al. 1996; Zeng et al. 2000, Diamond et al. 1994; Fagerli et al. 2008). La mutation ou la délétion du motif CAAX, induit une relocalisation des PRLs dans le noyau et le cytoplasme des cellules (Zeng et al. 2000; Wang et al. 2002; Sun et al. 2007; Si et al. 2001; Song et al. 2009). De même que l'inhibition de la farnésyltransférase par un inhibiteur pharmacologique (FTI) induit un changement de localisation de PRL-1 et PRL-3 vers le noyau des fibroblastes NIH3T3 stablement transfectés (Zeng et al. 2000; Wang et al. 2002). Ces observations suggèrent que la localisation membranaire des PRLs est dépendante de leur farnésylation, et qu'une relocalisation vers le noyau ou le cytoplasme pourrait être provoquée par un événement de régulation qui empêcherait cette modification post-traductionnelle. De plus, l'ancrage des PRLs aux membranes semble essentiel à leurs fonctions pro-migratoires et pro-métastatiques. En effet, il a été montré que faire exprimer un mutant CAAX non prénylable (SAAX) de PRL-1 et PRL-3 dans des cellules de cancer colorectal SW480 inhibait leurs capacités migratoires *in vitro* et invasives *in vivo* (Fiordalisi et al. 2006). Aussi, l'expression de mutants non prénylables de PRL-1 induit un défaut mitotique des cellules Hela (J. Wang et al. 2002) et une inhibition de la migration et de la croissance des cellules HEK 293T exprimant une forme mutée de PRL-1 (Sun et al. 2007). Song et al ont également montré qu'exprimer des mutants du motif CAAX de PRL-3 (CCVM) dans une lignée cellulaire de mélanome cutané B16F1 ou inhiber la farnésylation avec l'inhibiteur de la farnésyltransférase FTI-277 dans des cellules B16F1 exprimant PRL-3 sauvage diminuait leur capacité migratoire *in vitro* et invasive *in vivo* dans des

modèles murins xéno greffés (Song et al. 2009) . Ces résultats soulignent l'importance des effets régulateurs des PRLs, et notamment ceux de PRL-3, à la membrane plasmique dans le processus métastatique et suggèrent que PRL-3 pourrait avoir un rôle et des cibles aux membranes plasmiques et intracellulaires de l'appareil de Golgi et des endosomes.

La région polybasique adjacente au motif de prénylation CAAX est composée d'un ensemble d'acides aminés chargés positivement qui semble crucial dans la fixation des PRLs aux membranes lipidiques chargées négativement, probablement par la formation d'interactions électrostatiques (Sun et al. 2007). La substitution d'un ou des six résidus basiques de cette région en alanine abolit l'adressage de PRL-1 à la membrane (Sun et al. 2005) ainsi que la prolifération et la migration des cellules HEK293 surexprimant PRL-1 (Sun et al. 2007).

Bien qu'en majeure partie localisées à la membrane plasmique, une localisation nucléaire des phosphatases PRL-1 et PRL-3 a été rapportée (Diamond et al. 1994; Fagerli et al. 2008). Cette localisation est spécifique des types cellulaires et est observée sous certaines conditions. PRL-1 a été découvert dans le noyau des fibroblastes NIH3T3 (Diamond et al. 1994); et spécifiquement dans le noyau des cellules hépatiques fœtales ou suite à une hépatectomie durant la régénération du foie (Diamond et al. 1996). La surexpression de PRL-1 recombinant dans des cellules HeLa, change de localisation au rythme du cycle cellulaire et de manière indépendante de la farnésylation. A l'interphase elle est localisée à la membrane du réticulum endoplasmique et est trouvée localisée au niveau du centrosome et du fuseau mitotique des cellules en division, suggérant un rôle de PRL-1 dans la prolifération à travers la régulation de la mitose (Wang et al. 2002). PRL-1 est également localisée dans le noyau des cellules de plusieurs types de tissus épithéliaux incluant les cellules intestinales différenciées (Diamond et al. 1996; Kong et al. 2000), et les cellules zymogènes gastriques (Kong et al. 2000). Cependant dans les autres tissus, tel que la rétine, PRL-1 n'est pas nucléaire (Yarovinsky et al. 2000). Dans des cellules de myélome, Fagerli et al ont montré que PRL-3 fait des allers-retours entre le noyau et le cytoplasme durant les transitions S/G2-M et Go/G1 (Fagerli et al. 2008). Tout récemment, Lian et al ont décrit 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) (Lian et al. 2017) . Une étude a invalidé l'hypothèse que le transport de PRL-3 dans le noyau serait dû à la région polybasique servant de signal de localisation nucléaire, suggérant que le transport nucléaire se ferait par diffusion passive ou par d'autres procédés alternatifs (Pascaru et al. 2009).

- En conclusion dans diverses situations de surexpression dans des cellules cancéreuses on peut trouver la protéine PRL-3 principalement localisée dans les membranes lipidiques (membrane plasmiques et endosomes), et dans une moindre mesure libre dans le cytoplasme et dans le noyau.

1.2. Expression normale et pathologique des PRLs

Le premier membre de la famille des PRLs -PRL-1 -a été découvert et défini comme un gène induit dans le foie régénérant et dans des fibroblastes embryonnaire murins (NIH3T3) (Diamond et al. 1994). La comparaison de la séquence protéique de PRL-1 avec les bases de données de recherches ont directement mené à l'identification des deux autres membres : PRL-2 et PRL-3 (Zeng et al. 1998).

1.2.1. Expression dans les tissus normaux

D'abord recherchées dans des modèles murins, les expressions des ARNm PRL-1, ARNm PRL-2 et ARNm PRL-3 ont été identifiées dans le muscle squelettique, cependant leur expression a également été identifiée dans différents tissus en fonction des PRLs. (a) Chez le rat, PRL-1 présente des niveaux d'expressions élevés dans le cerveau, le muscle squelettique et dans différents tissus épithéliaux du système digestif (Diamond et al. 1994; Takano et al. 1996; Zeng et al. 1998). L'ARNm de PRL-2 est largement exprimé dans l'hypophyse, le cortex cérébral, les glandes surrénales, les testicules, ainsi que dans les reins et le cœur (Carter 1998; Zeng et al. 1998; <http://www.proteinatlas.org/>). L'ARNm PRL-3 a, pour sa part, été retrouvé dans le cœur du fœtus du rat. (b) Chez la souris, PRL-1 et PRL-2 présentent une expression ubiquitaire avec une prédominance élevée du muscle squelettique pour PRL-2. L'ARNm PRL-3 est majoritairement exprimé dans le cœur et le muscle squelettique adulte (Zeng et al. 1998). Elle est aussi exprimée 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 (Zimmerman et al. 2014). (c) Dans des tissus humains adultes, PRL-1 et PRL-2 sont, comme chez la souris, semblent exprimées plus largement que PRL-3. L'ARNm de PRL-3 est principalement exprimé dans le muscle squelettique et le cœur. Il est néanmoins détectable à de faibles taux dans 35 autres tissus humains incluant la rétine et le foie pancréas (Matter et al. 2001) (site : www.genecards.org). La protéine présente une expression 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 du poisson-zèbre et celui des invertébrés : drosophile et amphioxus. Dans le poisson-zèbre PRL-1 et PRL-2 partagent 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. Lin et al ont identifié l'existence d'un seul membre PRL dans 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'expression d'une seule phosphatase PRL chez les invertébrés *C. Elegans* et *Drosophila* et *Amphioxus* suggère que des évènements de duplications multiples ont permis de générer les trois membres des PRLs, durant l'évolution des vertébrés (Lin et al. 2013) .

- L'ensemble de ces observations indiquent que les membres des PRLs seraient conservés entre 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.

1.2.2. Rôles physiologiques

Peu de données existent sur les rôles physiologiques des membres des PRLs. Bien qu'ils présentent une forte homologie de séquence et de structure, nous avons vu dans le paragraphe précédent que leurs profils d'expression diffèrent selon les tissus et les espèces, surtout entre PRL-3 et PRL-1/PRL-2 ce qui suggère que les membres de PRLs auraient des fonctions tissu-spécifiques.

PRL-1 :

PRL-1 est un gène détecté dans les photorécepteurs de la rétine des mammifères (Yu et al. 2007; Yarovinsky et al. 2000) et plus précisément dans les photorécepteurs en cônes de la fovéa de la rétine qui sont responsables de la distinction des couleurs et d'une bonne résolution optique. Ling Yu et al ont identifié une modulation de l'expression et de l'activité de PRL-1 en condition oxydative. Ils ont montré que l'oxydation inhibe de manière réversible l'activité de PRL-1 par la formation d'un pont disulfure entre la cystéine active 104 et la cystéine 49 dans un modèle *in vitro*, et *in vivo* dans des cellules de rétine en culture et dans des rétines isolées exposées au peroxyde d'hydrogène. De même, le stress oxydant entraîne une rapide augmentation de l'expression de PRL-1, ce qui propose PRL-1 comme un composant moléculaire impliqué dans la réponse au stress oxydant des cônes de la rétine (Yu et al. 2007).

PRL-2 :

Comme tel est le cas avec les deux autres membres de la famille des PRLs, les fonctions physiologiques de PRL-2 sont encore peu connues. Durant ces dernières années quelques études montrent une implication de PRL-2 dans la spermatogénèse (Dong et al. 2014), le développement du placenta (Dong et al. 2012) et dans la prolifération des cellules souches hématopoïétiques (Kobayashi et al. 2014). Ces découvertes apportent des arguments supportant l'hypothèse que PRL-2 aurait un rôle dans la prolifération cellulaire. Dong et al démontre dans des modèles murins, que l'expression de PRL-2 est nécessaire pour le développement du placenta. En absence de PRL-2, AKT est inactif et PTEN est surexprimée ce qui conduirait à un blocage de la prolifération des spongiotrophoblastes, une couche cellulaire en périphérie de l'embryon, à une hypertrophie placentaire et à un retard de croissance du fœtus (Dong et al. 2012). Cette étude révèle un aspect régulateur de PRL-2 dans l'inhibition du gène supresseur de tumeur PTEN. De même, l'inhibition de PTEN par PRL-2 serait un des mécanismes impliqués dans la spermatogénèse. En effet, une perte d'expression en PRL-2 causerait une

hypertrophie des testicules, une baisse de la production du sperme et du potentiel reproducteur associé. Ces troubles seraient dus à une inactivation de la voie PI3K impliquant le récepteur c-kit et à l'expression élevée de PTEN en absence de PRL-2 (Dong et al. 2014). Enfin il a été montré que PRL-2 favoriserait la prolifération des cellules souches hématopoïétiques et progénitrices (HSCP), en partie, par le contrôle des régulateurs du cycle cellulaire p21 et p57. Bien que l'expression de p21 et P57 soit diminuée dans des souris PRL-2 $-/-$, le mécanisme de régulation de ces inhibiteurs de CDK reste inconnu (Kobayashi et al. 2014).

PRL-3 :

Notre laboratoire a identifié le rôle important de PRL-3 dans la migration des cellules de crêtes neurales céphaliques (CCNCs), pendant le développement embryonnaire du *Xenopus laevis*. Il a été montré que la perte de fonction de PRL-3 provoque une réduction du territoire des CCNCs, alors que le gain de fonction de cette phosphatase en accroît le domaine. De plus, l'inhibition pharmacologique de PRL-3 dans des cellules de CCNCs en culture diminue significativement leur vitesse de migration *in vitro*. Les résultats de cette étude démontrent que PRL-3 est requis pour la migration des cellules CCNCs pendant le développement embryonnaire de *Xenopus laevis* (Maacha et al. 2013). Outre cette publication peu de choses sont connues sur le rôle physiologique de PRL-3. C'est une protéine associée aux cancers métastatiques, par conséquent les recherches portent majoritairement sur son rôle dans les cancers (voir section II.2).

Un modèle murin d'inactivation du gène PRL-3 a été créé pour étudier les effets de la perte d'expression de cette protéine. Les souris PRL3 $^{+/+}$ et PRL3 $^{-/-}$ sont traitées avec un agent tumorigène, l'azoxymethane, qui lorsqu'il est utilisé en combinaison avec l'agent inflammatoire Dextran Sodium Sulfate induit des tumeurs malignes colorectales. Les tumeurs formées dans le colon des deux groupes de souris ont des volumes identiques mais sont deux fois moins nombreuses dans les souris PRL3 $^{-/-}$, ce qui suggère que la perte d'expression de PRL-3 protège les souris de la tumorigénèse. Ce résultat, qui a été confirmé avec un modèle de souris transgénique TRE-PRL-3 inductible (tet on) (Lian et al. 2017), fournit une preuve de l'implication de PRL-3 dans le développement du cancer colorectal (Zimmerman et al. 2013).

1.2.3. Expression des PRLs dans les cancers

L'implication des membres des PRLs dans les cancers est bien établie, et plus particulièrement concernant PRL-3. La surexpression des phosphatases PRLs dans les cancers humains métastatiques supporte l'idée qu'elles participent à la migration et l'invasion cellulaire lors de la dissémination métastatique.

PRL-1 :

La phosphatase PRL-1 est exprimée à des niveaux élevés dans les métastases ganglionnaires lymphatiques des adénocarcinomes (Y. Wang et al. 2007). PRL-1 est également exprimée dans des carcinomes rénaux, des mélanomes cutanés, et dans des lymphomes ovariens. La surexpression de PRL-1 dans des cellules cancéreuses du pancréas et des poumons augmente leurs propriétés

migratoires et invasives (Stephens et al. 2008; Luo et al. 2009; Wang et al. 2002). 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) (Rios et al. 2012) (Al-Aidaros & Zeng 2010).

PRL-2 :

Parmi les trois membres des PRLs, PRL-2 est le membre le moins étudié. PRL-2 est surexprimée dans des lignées cellulaires et/ou tumeurs primaires du cancer du poumon, du cancer du sein, et du pancréas (Wang & Lazo 2012; Hardy et al. 2010; Stephens et al. 2008). Comme PRL-1, PRL-2 est également exprimée à des niveaux importants dans les carcinomes de la prostate. Le double knock-down de l'expression de PRL-1 et PRL-2 par interférence ARN induit une diminution de la migration et de la formation de colonies en agar mou des lignées cellulaires cancéreuses pancréatique PANC1 et MIA PaCa-2 (Stephens et al. 2008). 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 (Hardy et al. 2010).

PRL-3 :

La surexpression et la mécanistique de PRL-3 dans les cancers sont très étudiées car c'est la plus fréquente des trois membres de la famille à être surexprimée dans les cancers. PRL-3 est retrouvée dans une grande variété de cancers. La section suivante sera consacrée à détailler l'expression de PRL-3 dans les cancers humains, son implication dans la progression tumorale et les processus cellulaires potentiellement impliqués dans son mécanisme d'action.

2. PRL-3 et implication dans les cancers

2.1. Expression de PRL-3 dans les cancers

2.1.1. Surexpression de PRL-3 dans les cancers : une protéine aux actions pleïotropes

PRL-3 est le premier membre de la famille des PTP à avoir été décrit dans les cancers. Cet engouement pour la phosphatase PRL-3 a été suscité lorsque le groupe de Vogelstein a identifié la surexpression du gène PTP4A3/PRL-3 dans l'ensemble des métastases hépatiques du cancer colorectal analysées. En comparaison, une expression très faible a été détectée dans les cancers colorectaux non-métastatiques et elle est quasi-indétectable dans l'épithélium du côlon sain. La surexpression de PRL-3 semble clairement corrélée à la progression tumorale et au développement métastatique de ce cancer (Saha et al. 2001). Les observations faites par Saha et al ont ultérieurement été confirmées par d'autres études mettant en évidence la surexpression du transcrit et de la protéine PRL-3 dans des tumeurs primaires de cancer colorectal (Kato et al. 2004; Y. Wang et al. 2007; Peng et al. 2004;

Bardelli et al. 2003). Une étude réalisée sur une cohorte de 177 tumeurs primaires de cancer colorectal, montre une expression élevée du transcrite PRL-3 dans ~45% des tumeurs et une grande proportion des tumeurs issues de patients ayant développé des métastases dans le foie ou dans les poumons présentent une surexpression significative de PRL-3 (84,4% et 88,9% respectivement) (Kato et al. 2004). Bardelli et al ont également évalué par hybridation *in situ* l'expression de l'ARNm PRL-3 dans l'épithélium sain et les tumeurs primaires non métastatiques du cancer colorectal, et ils y ont observé une absence d'expression de cette protéine. A l'inverse, ils ont observé une importante expression de PRL-3 dans différents sites de métastases, et ceci qu'elles soient proches et localisées dans les ganglions lymphatiques, ou bien qu'elles soient localisées dans des organes distants tels que le foie, les poumons, le cerveau ou les ovaires. 86% à 100% des échantillons analysés présentaient une surexpression de PRL-3 (Bardelli et al. 2003).

L'expression anormale de PRL-3 ne se restreint pas qu'au cancer colorectal. Sa surexpression a également été décrite dans de nombreux types de cancers comprenant les carcinomes gastriques (Miskad et al. 2004; Miskad et al. 2007), le cancer du sein (Wang et al. 2006), le cancer ovarien (Polato et al. 2005) et le mélanome uvéal (Laurent et al. 2011) (Al-Aidaros & Zeng 2010) mais également les leucémies myéloïdes et les myélomes multiples (Qu et al. 2014; Broyl et al. 2010). La liste des cancers sur exprimant PRL-3 est récapitulée dans le tableau II.3.

A l'exception du cancer du poumon, la grande majorité des études montrent une corrélation entre le niveau d'expression de PRL-3 et la progression métastatique de divers cancers humains. Cela en fait un marqueur d'agressivité intéressant pour le diagnostic de ces cancers. De plus PRL-3 serait plus qu'une simple conséquence de la tumorigénèse. En effet les données de la littérature décrivent un rôle de PRL-3 dans les mécanismes de la progression tumorale et de la dissémination métastatique (section II 2.2). De nombreuses études de surexpression et de sous-expression par interférence ARN ont montré que PRL-3 module la prolifération cellulaire en fonction des types cellulaires *in vitro* (Liang, et al. 2007), favorise la transition épithélio-mésenchymateuse (Liu et al. 2009; H. Wang et al. 2007), l'angiogénèse (Guo et al. 2006; Ming et al. 2009), la migration cellulaire et l'invasion *in vitro* (Kato et al. 2004; Miskad et al. 2007; Laurent et al. 2011; Zeng et al. 2003).

Par des approches similaires, l'utilisation du mutant catalytiquement inactif C104S a montré l'importance de l'activité phosphatasique de PRL-3 pour ces phénomènes, et l'utilisation du mutant CAAX ou d'un inhibiteur de farnésyltransférase de son ancrage membranaire (Zeng et al. 2003; Kato et al. 2004; Song et al. 2009; Guo et al. 2004) [liste de publications non exhaustives]. Plusieurs études réalisées dans des modèles murins de xéno greffes permettent d'identifier la surexpression de PRL-3 comme une altération clé conduisant à la croissance de la tumeur primaire et à la dissémination métastatique.

- Ces observations permettent d'identifier la surexpression de PRL-3 comme un acteur central de la progression tumorale et du développement métastatique. En revanche aucune mutation « driver » n'a été décrite dans la phase codante du gène PTP4A3/PRL-3.

METHODE	ECHANTILLONS	SUREXPRESSON DE PRL-3 (%)	CORRELATION	REF. Bibliographiques
COLORECTAL				
IHC et HIS	tissu normal	0 - 7,6	métastases	Voir bessette et al
	TP	16,3 - 44,6		
	métas hépatiques	66,7 - 100		
	métas ganglionnaires	24,14 - 100		
	métas cérébrales	100		
	métas ovariennes	100		
GASTRIQUE				
IHC et HIS	tissus normaux	0	invasion, métastases, survie	Voir bessette et al
	TP primaires non métastatiques	13,3 - 86,7		
	méta ganglionnaires	27,1 - 92,6		
	méta péritonéales	92,1		
SEIN				
IHC	382 TP	34,8	survie	(Wang et al. 2006)
IHC	135 carcinomes in situ	85,9	métastases et invasion	(Radke et al. 2006)
	147 carcinomes invasifs	75,5		
IHC	24 métas ganglionnaires	91,7	survie	(den Hollander et al. 2016)
	102 TP triples négatifs	29		
OVAIRES				
HIS	61 TP stade I	++	stade tumoral	(Polato et al. 2005)
	23 TP stade III	+++		
IHC	30 tissus sains	0	pas de corrélation	(Ren et al. 2009)
	119 TP	36,1		
ESOPHAGE				
RT-PCR	40 tissus sains	10	stade tumoral	(Liu et al. 2008)
	40 TP	32,5		
	21 TP métastatiques	47		
	19 TP non métastatiques	15,8		
IHC	tissu sain	0	invasion et métastases	(Ooki et al. 2010)
	88 TP	78		
COL DE L'UTERUS				
IHC		(- / + / ++ / +++)	invasion et Métastases	(Ma & Li 2011)
	22 tissus sains	11/ 9/ 2/ 0		
	30 dysplasies modérées- sévères	5/ 12/ 10/ 3		
	90 TP	2/ 15/ 16/ 27		
NASOPHARYNGE				
IHC	174 TP	55,7	Stade tumoral et Métastases	(Zhou et al. 2009)
FOIE : CHOLONGIOMME				
IHC	102 tissus sains	0	Stade tumoral, invasion et métastases	(Yijun Xu et al. 2010)
	102 TP	47,1		
	62 TP métastatiques	61,3		
	62 métas ganglionnaires	80,6		
FOIE: HEPATOCARCINOME				
qRT-PCR et IHC	42 tissus sains	28,7	invasion	(Y. Wang et al. 2007; Zhao et al. 2008)
	42 TP	57,3		
POUMONS				
PCR	5 tissus sains	+	métastases	(Yamashita et al. 2007)
	5 TP métastatiques	+++		
IHC	94 TP	+++	Métastases et Stade tumoral	(Zhang et al. 2010; Ming et al. 2009)
	92 TP	69,6		
GLIOME				
HIS et HIS	tissu sain	0	nd	(Kong et al. 2007)
	gliome stade I	0		
	gliome stade II	5,3		
	gliome stade III	24,4		
	gliome stade IV	50		

MELANOME UVEAL				
GEP et IHC	29 TP meta0	+	métastases et survie	(Laurent et al. 2011)
	28 TP meta1	+++		
	115 Métastases	+++		
PROSTATE				
GEP et IHC	38 TP de faible risque méta	+++	nd	(Vandsemb et al. 2016)
	40 TP de risque méta inter	+++		
	36 TP de haut risque méta	+++		
	40 Tissus sains	+		
LEUCEMIE MYELOIDE AIGUE				
RT-PCR	112 ME de LMA	++ (médiane 13,5)		(Qu et al. 2014)
	16 ME saines	+ (médiane 5,5)		
MYELOME MULTIPLE				
GEP	TP	+++	Nd pour méta, survie	(Broyl et al. 2010)
BOUCHE				
RT-PCR	40 TP	++	nd	(Hassan et al. 2011)
	12 tissus sains	-		

Tableau II.3 : Expression de PRL-3 dans les tumeurs primaires et métastases des cancers humains.
 Abréviations : TP : tumeurs primaires ; IHC : immunohistochimie ; HIS : Hybridation in situ ; méta : métastases ; -/+ /++ /+++ : expression nulle/ faible/moyenne/forte. Adapté (Bessette et al. 2008)

2.2. Voies de signalisation modulées par PRL-3

De nombreux groupes tendent à investiguer l'implication de PRL-3 dans les mécanismes menant au développement métastatique et à identifier ses substrats directs intervenant dans les effets pro-tumoraux de PRL-3.

2.2.1. Partenaires d'interaction et substrats directs de la phosphatase PRL-3 : Focus sur des protéines de la migration et de l'adhérence cellulaire

Les partenaires d'interaction et substrats identifiés sont essentiellement des médiateurs moléculaires des interactions cellules-cellules ou des cellules avec la matrice extracellulaire, ce qui est en accord avec la fonction de cette protéine dans les processus de migration et d'invasion des cellules cancéreuses. Ces protéines sont : l'ezrine (Forte et al. 2008; Orsatti et al. 2009), la kératine 8 (Mizuuchi et al. 2009), la stathmine (Zheng et al. 2010), l'intégrine $\alpha 1$ (Peng et al. 2006), l'intégrine $\beta 1$ (Tian et al. 2012), la petite GTPase ARF1 (Krndija et al. 2012), ou encore le PI(4,5)P2 (McParland et al. 2011) et JAM2 (Lian et al. 2016); mais également le facteur d'élongation 2 (EF-2) (Orsatti et al. 2009), la nucléoline (Semba et al. 2010) et RAP1/TRF2 (Lian et al. 2017). Les substrats et interactants de PRL-3 sont listés dans le tableau II.4

Ces interactions avec PRL-3 ont été identifiées par des approches protéomiques et/ou phosphoprotéomiques comparatives entre les cellules exprimant PRL-3 sauvage et les cellules contrôles exprimant le mutant inactif C104S ou un vecteur vide, ou par double hybride. La déphosphorylation n'a pas toujours été étudiée.

La déphosphorylation du PI(4,5) P2 a été élucidé *in vitro* et notre laboratoire a récemment mis en évidence sa déphosphorylation *in vivo* dans des cellules embryonnaires du rein humains (HEK293T) (résultats non publiés L. Mery).

Tian et al ont montré une interaction entre PRL-3 et l'intégrine $\beta 1$ par GST-pulldown avec des extraits cellulaires de cancer colorectal (HCT116) et gastrique (BGC82), et la déphosphorylation a été montré *in vivo* sur le résidu tyrosine 783 intracytoplasmique de l'intégrine $\beta 1$ (Tian et al. 2012). [Le rôle des ce résidu sera détaillé dans la partie III car l'étude de l'état de phosphorylation de l'intégrine $\beta 1$ est un aspect de mes travaux de thèse]. Des expériences de surexpression ou de sous-expression dans une lignée de cancer colorectal confirme que la phosphorylation est soit moins intense soit plus forte en absence ou en présence de la phosphatase.

L'eitrine, le PI (4,5) P2, les intégrines $\beta 1$ et $\alpha 1$, la cadhérine CDH22, la keratine 8 et la stathmine...etc (partie supérieure du tableau II4) sont des éléments constitutants ou régulateurs du cytosquelette, de l'adhérence cellule-cellule ou cellule/matrice extracellulaire qui interviennent toutes, à leur manière, dans la régulation de la migration cellulaire et peuvent contribuer aux effets pro-migratoires induits par PRL-3 pendant la dissémination métastatique. Par exemple, l'eitrine est un composant du complexe ERM (ezrin-radixine-moesine), qui connecte les filaments d'actine à la membrane plasmique et qui est impliquée dans le processus métastatique (Ren & Khanna 2015; Mäkitie et al. 2001), la déphosphorylation de l'eitrine impliquant la phosphatase PRL-3 promeut la croissance tumorale et la formation et la néovascularisation (Forte et al. 2008).

2.2.2. Voies de signalisation médiées par PRL-3

Ces dernières décennies, les recherches sur cette phosphatase se sont multipliées et de nombreuses études ont permis de relier l'expression de PRL-3 à des mécanismes liés au processus pro-métastatique tels que l'angiogenèse, la transition-épithélio-mésenchymateuse (TEM), la migration par le contrôle du remodelage du cytosquelette d'actine et de l'adhérence ou encore l'invasion. Ces effets pro-métastatiques sont en partie permis par la régulation des cibles indirectes et des partenaires de PRL-3 intervenant dans les voies de signalisation : les GTPases Rho, les intégrines, l'interleukine 4 et 6, AKT/PI3K et p53/MDM2. La figure II.17 Page 79 résume les systèmes de régulation de PRL-3 et la signalisation en aval

L'activation de voies de signalisation en aval de PRL-3 à travers la kinase PI3K, MAPK aboutit à la régulation transcriptionnelle de diverses protéines d'adhérence et de remodelage de la matrice extracellulaire ou du cytosquelette comme, entre autres, certaines métalloprotéases (MMPs) et intégrines ainsi que des marqueurs de transition épithélio-mésenchymateuse comme les cadhérines.

Tableau II.4 Partenaires et substrats identifiés de la phosphatase PRL-3. Abreviations : IP : immunoprécipitation ; MEC : matrice extracellulaire ; EF2 : Facteur d'élongation 2. Adapté de (Al-Aidaros & Zeng 2010)

Substrats et Interactants	Conséquence de l'interaction (modèle cellulaire)	Méthode de validation	Rôle dans la cellule	Références bibliographiques
Ezrine	Déphosphorylation in vitro et in vivo (HCT116 : colorectal)	Test d'activité phosphatase in vitro	Lien entre les filaments d'actine (F-actine) et la membrane plasmique	(Forte et al. 2008; Orsatti et al. 2009)
Kératine 8	Déphosphorylation in vivo (SW480 : colorectal)	IP et colocalisation	Constitue les filaments intermédiaires	(Mizuuchi et al. 2009)
Intégrine $\beta 1$	Déphosphorylation in vivo (HCT116 et BGC83 : gastrique)	GST-Pull Down	Récepteur transmembranaire et Pontage entre MEC et cytosquelette d'actine	(Tian et al. 2012)
PI(4,5)P2	Déphosphorylation in vitro et in vivo (Mery non publié)	-	Modulateur de la dynamique du cytosquelette	(McParland et al. 2011)
stathmine	-	IP	Dépolymérisation des microtubules	(Zheng et al. 2010)
Intégrine $\alpha 1$	-	Double hybride et GST-pull down	Récepteur transmembranaire et Pontage entre MEC et cytosquelette d'actine	(Peng et al. 2006a)
ARF1	-	GST-Pull Down et Co-IP	Trafic vésiculaire	(Krndija et al. 2012)
CDH22	-	Double hybride et IP	Adhérence cellule-cellule et connectée à la F-actine	(Liu et al. 2009)
JAM2	-	Double hybride et IP	Adhérence cellule-cellule	(Lian et al. 2016)
Nucléoline	Déphosphorylation in vivo (SW480)	IP	Synthèse et maturation des ribosomes	(Semba et al. 2010)
EF-2	Déphosphorylation in vivo (HCT116)	-	Traduction des protéines	(Orsatti et al. 2009)
FKBP38	-	Double hybride	Stabilisation des protéines	(Choi et al. 2009)
RAP1/TRF2	-	GST-pull down	Protection des télomères	(Lian et al. 2017)

Dans des cellules de carcinome colorectal DLD-1, la surexpression d'un PRL-3 exogène provoque la phosphorylation et l'activation de la sérine/thréonine kinase AKT, et dans un même temps l'inactivation du substrat d'AKT, GSK3 β , conduisant à l'activation de la voie PI3K/AKT (H. Wang et al. 2007). Ces deux événements sont dépendants de l'activation de la PI3K, et sont abolis lorsque les cellules exprimant PRL-3 sont traitées avec un inhibiteur de la PI3K. L'activation d'AKT en présence de PRL-3 serait la conséquence de l'inhibition de l'expression de PTEN (H. Wang et al. 2007). PTEN est une PDS qui déphosphoryle le PI (3, 4,5) P₃, et s'oppose ainsi à l'action de la PI3K qui catalyse la phosphorylation du PIP₂ en PIP₃. Plus encore, la surexpression de PRL-3 dans les cellules DLD-1 cause de manière dépendante à l'activation de la voie PI3K/AKT, la diminution des marqueurs épithéliaux (E-cadhérine, γ -caténine, Intégrine $\beta 3$), au profit de l'expression de marqueur mésenchymateux (Snail, Fibronectine) (H. Wang et al. 2007).

Wang et al révèle également d'autres conséquences moléculaires de la surexpression de PRL-3, qui dans le cas présent sont en lien avec l'adhérence cellulaire. Dans une lignée cellulaire immortalisée de l'ovaire (CHO) ou de cellules de cancer du col de l'utérus (HeLa) la surexpression de PRL-3 induit une diminution du niveau d'expression de la paxilline et de la vinculine (H. Wang et al. 2007), deux composants moléculaires des plaques d'adhérence focale -des structures essentielles à l'adhérence et à la dynamique de migration cellulaire. Cela place PRL-3 au centre de la régulation de l'adhérence et du cytosquelette, dont la dynamique de remodelage est fondamentale pour la migration et l'invasion des cellules (voir partie III). Ceci suggère donc l'implication de PRL-3 dans l'adhérence cellulaire.

A ce propos, PRL-3 semble moduler l'adhérence essentiellement par la signalisation des intégrines. En effet, dans un modèle cellulaire de cancer colorectal (LOVO) exprimant PRL-3, la kinase ERK1/2 est activée dépendamment de l'intégrine $\beta 1$. Peng et al montre que PRL-3 réduit le niveau de phosphotyrosine de l'intégrine $\beta 1$, et améliore la phosphorylation de ERK $1/2$, ceci ayant pour conséquence la perturbation de l'adhérence cellulaire, et la promotion de la progression tumorale et des métastases. De plus, non seulement la phosphorylation d'ERK1/2 est éteinte lorsque les cellules sous-expriment l'intégrine $\beta 1$ mais la migration et l'invasion cellulaire *in vitro et in vivo* sont également abolies (Peng et al. 2009). La kinase Src, responsable de la phosphorylation d'ERK1/2, est activée en présence de PRL-3 et mène également à la phosphorylation du facteur de transcription STAT3 et de la protéine adaptatrice p130cas (Liang, Liang, et al. 2007). L'activation de Src via la non-phosphorylation du résidu Tyrosine 527, fait suite à l'inhibition de son régulateur négatif, la kinase Csk, par PRL-3 et conduit à l'activation de la voie MAPK (Liang et al. 2008). L'induction de cette voie est une des conséquences de l'activation de la signalisation des intégrines. De manière différente, il a été montré que PRL-3 favorise la migration cellulaire par la régulation du recyclage de l'intégrine $\alpha 5$ au travers de l'activation de ARF1 (Krndija et al. 2012)

Ajouté à cela les études qui associent PRL-3 au remodelage du cytosquelette d'actine par la régulation de la famille des GTPases Rho. Ces protéines sont impliquées dans la polymérisation de l'actine, la formation des fibres de stress et des plaques d'adhérence focale, et dans la formation des protrusions nécessaires à la migration. L'expression des GTPases Rho A et RhoC est augmentée dans des cellules de carcinome colorectal SW480 exprimant PRL-3. En revanche l'activité de la protéine Rac est diminuée et celle de cdc42 reste inchangée. Le traitement de ces cellules par un inhibiteur de la kinase ROCK, agissant en aval de Rho abolit la migration et l'invasion induites par PRL-3 (Fiordalisi et al. 2006). Ces résultats suggèrent que PRL-3 agit en amont des GTPase Rho dont la régulation semble complexe. Il est par ailleurs intéressant de noter que l'eitrine recrute des régulateurs négatifs et positifs des GTPases Rho. L'inactivation de l'eitrine par PRL-3 libère les protéines Rho de tout contrôle, en les maintenant sous leur forme active, ce qui peut expliquer leur activation en présence de PRL-3 (Al-Aidaros & Zeng 2010).

Outre que leur implication directe dans l'adhérence cellulaire, les intégrines contribuent également à la migration cellulaire par le recrutement des protéases appelées les métalloprotéases à la membrane plasmique (voir section III). Ces dernières sont des enzymes sécrétées par les cellules qui clivent de façon spécifique les composants de la matrice extracellulaire (Brooks et al. 1996; Stefanidakis & Koivunen 2006). Il a été découvert que la migration des cellules cancéreuses exprimant PRL-3 pouvait

être facilitée par la dégradation de la matrice extracellulaire causée par la métalloprotéase MMP2. Par l'inhibition de l'inhibiteur de MMP2 (TIMP2), PRL-3 induit une augmentation de l'expression de MMP2 et par conséquent une amélioration de son activité gélatinolytique (Peng et al. 2009). De même, si l'inhibition de l'expression de MMP7 par interférence ARN abolit la migration et l'invasion des cellules colorectales DLD-1 exprimant PRL-3, sa surexpression en augmente la migration. De plus il a été montré que l'utilisation d'un inhibiteur de la farnésyltransférase (LB42908) réduit l'expression de MMP7 (Lee et al. 2012).

- L'ensemble de ces observations appuie l'hypothèse qu'à travers diverses voies de signalisation, PRL-3 à la membrane plasmique, sur les endosomes ou libre dans le cytoplasme et le noyau favoriserait la migration cellulaire par la régulation d'acteurs de l'adhérence, du remodelage du cytosquelette et de la matrice extracellulaire.



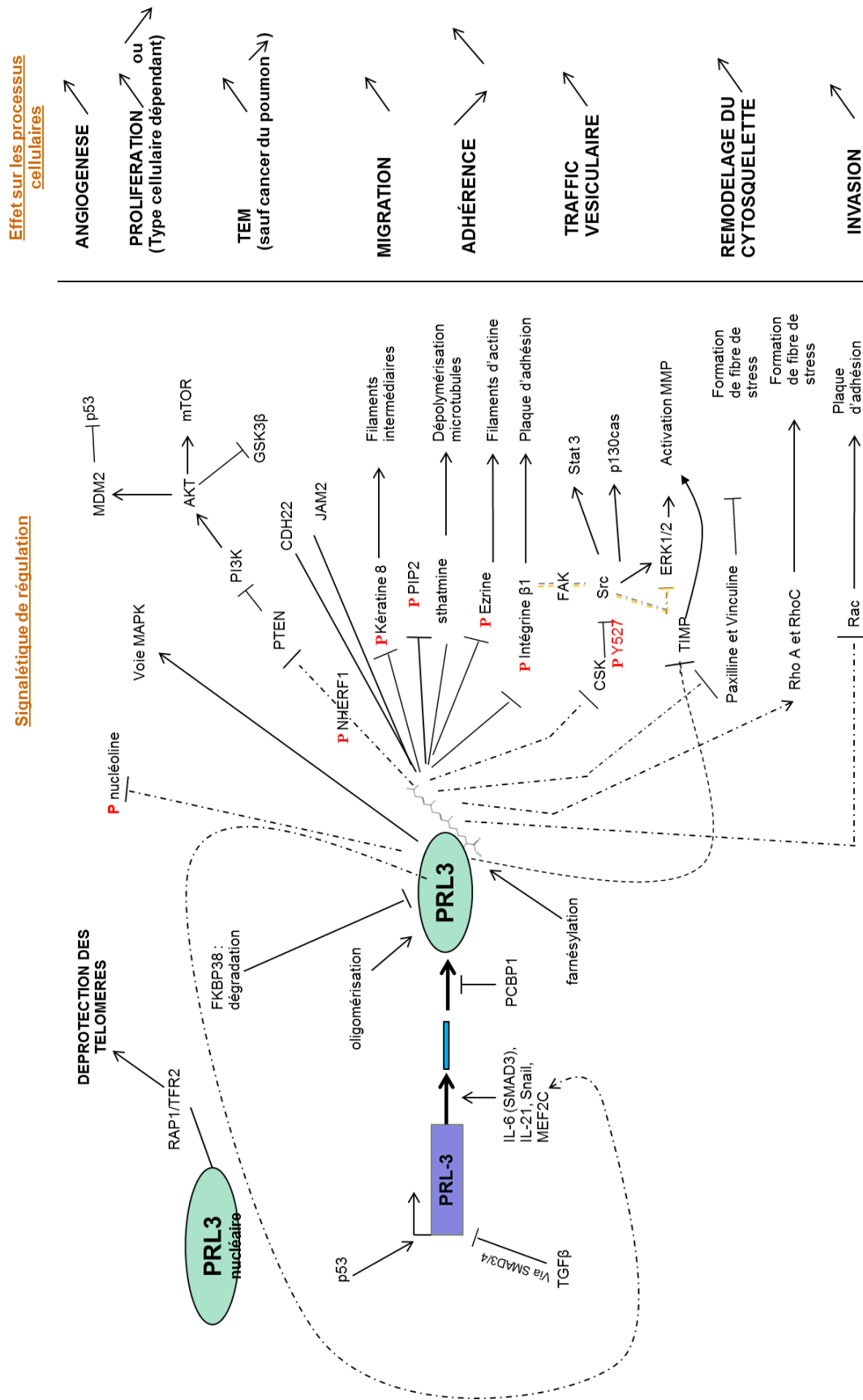
(page suivante) **Figure II.17 : Modèle d'un réseau de la régulation et de la signalisation de la phosphatase PRL-3.** Trait plein : substrat direct ; trait pointillé : effet indirect sur la protéine ; P : phosphate  : augmentation,  : diminution.

Figure III.17 : Modèle d'un réseau de la régulation et de la signalisation de la phosphatase PRL-3



2.3. Régulation de la phosphatase PRL-3

La surexpression de PRL-3 apporte une contribution élémentaire à la progression tumorale, la migration cellulaire, l'invasion et le développement métastatique des cancers. Comme vu ci-dessus, les données concernant les mécanismes dérégulés par PRL-3 et les voies de signalisation impliquées dans la tumorigénèse des cancers, sont en pleine émergence. De récentes études ont également contribué à enrichir notre connaissance de cette protéine en apportant des données concernant sa régulation à différents niveaux.

L'expression, l'activité et la localisation subcellulaire de PRL-3 sont clairement associées à la tumorigénèse et à la progression métastatique des cancers impliquant cette phosphatase. Dans cette partie nous aborderons les systèmes de régulation positifs et négatifs connus de PRL-3 au niveau transcriptionnel, traductionnel et post-traductionnel.

2.3.1. Régulation transcriptionnelle

Le transcrite de PRL-3 est souvent trouvé très exprimé dans les tissus tumoraux et cette surexpression aurait une part de responsabilité dans la progression tumorale. L'amplification du gène PRL-3 dans la région 8q24 est retrouvée non seulement dans les tumeurs primaires métastatiques méta1 (classe 2) du mélanome uvéal, mais également dans les métastases du cancer colorectal (Saha et al. 2001), dans le cancer du sein (den Hollander et al. 2016) et les carcinomes gastriques (Ooki et al. 2011). L'amplification du gène PRL-3 pourrait ainsi expliquer la surexpression de la protéine dans certains types de cancers. Cependant, dans d'autres cancers comme c'est le cas avec mélanome uvéal, la surexpression de PRL-3 ne semble pas être une simple conséquence de l'amplification du gène PRL-3 (Laurent et al. 2011) suggérant une régulation à d'autres niveaux, en commençant par le premier stade : la transcription du gène PRL-3.

Il a été reporté que le gène suppresseur de tumeur p53 serait un activateur de la transcription de PRL-3 mais aussi de PRL-1 (Basak et al. 2008). La discordance entre l'action de p53 en tant que gène suppresseur de tumeur et les effets pro-métastatiques de PRL-3 peuvent s'expliquer pour la boucle de rétrocontrôle de l'expression de PRL-3 : P53 induit l'expression de PRL-3 et PRL-3 inhibe p53 en favorisant son ubiquitylation et sa dégradation (Basak et al. 2008; Min et al. 2010). Cependant comme l'activité de P53 est souvent perturbée durant les premières étapes de la progression des cancers (Hollstein et al. 1991), la surexpression de PRL-3 observée dans les cellules métastatiques requière une régulation alternative par l'intervention d'autres facteurs de transcription. Sur la base de prédictions bioinformatiques, il est supposé que le gène PRL-3 posséderait des séquences promotrices à la fixation des facteurs de transcription n-myc, STAT3 et NFκB. Une récente étude montre dans des cellules myéloïdes, que la stimulation de STAT3 par l'interleukine 6 induirait une augmentation de l'expression de l'ARNmPRL-3 d'un facteur 2,5 à 3,5 (Zhou et al. 2014). PRL-3 contribuerait également à l'activation de STAT3, suggérant que ces deux protéines formeraient une boucle de rétrocontrôle positive (Liang, Luo, Dong, Chad D. Walls, et al. 2008; Wang et al. 2009).

De même, Snail, un facteur de transcription à doigt de zinc, est capable d'induire la transcription de PRL-3 et de favoriser l'augmentation de son niveau d'expression protéique dans des cellules de cancer colorectal (Zheng et al. 2011). PRL-3 et Snail forme aussi une boucle de rétrocontrôle positive puisque la surexpression de PRL-3, contribue également à augmenter l'expression de Snail (Liu et al. 2009).

La libération d'un taux élevé du facteur de croissance VEGF dans le milieu extracellulaire qui mène à l'angiogenèse, contribueraient également à la transcription de PRL-3 par l'induction de l'expression du facteur de transcription MEF2C qui se fixe au promoteur du gène (Xu et al. 2011).

Concernant la régulation négative de la transcription de PRL-3, le TGF β est capable d'inhiber directement sa transcription par le biais de la fixation du facteur de transcription SMAD3 sur les boîtes E1 et E4 du promoteur PRL-3. La perte d'expression du TGF β dans les cellules cancéreuses mènerait à la surexpression de PRL-3 et à la progression tumorale (Jiang et al. 2011).

En plus des facteurs de transcription, l'implication de micro-ARNs dans la régulation de la transcription de PRL-3 a aussi été décrite. Li et al ont en effet découvert que les miR-495 et miR-551a régulaient négativement l'expression du transcrit et de la protéine PRL-3 dans des cellules de cancer gastrique, ainsi que la migration et l'invasion *in vitro* induites par PRL-3 (Li et al. 2012).

2.3.2. Régulation traductionnelle

Le niveau protéique de PRL-3 ne corrèle pas toujours avec son niveau en ARNm. Ceci est notamment observé dans le cancer colorectal, du sein, des poumons, du mélanome uvéal et dans d'autres types de cancers et suggère une régulation post-transcriptionnelle (Wang et al. 2010).

PCBP1 est une protéine de fixation aux ARN qui fixe préférentiellement les oligonucléotides dC dont le rôle est décrit dans la régulation de la transcription des ARNs, de l'épissage des pré-ARN, de la maturation et l'export de l'ARNm (Choi et al. 2009). PCBP1 interagit avec la région 5'UTR de l'ARNm PRL-3, inhibant sa traduction (Wang et al. 2010). La surexpression ou la perte d'expression de PCBP1 résulte respectivement en la diminution ou l'augmentation des niveaux protéiques de PRL-3, sans altérer le niveau d'expression du transcrit (Wang et al. 2010). Les expressions des protéines de PRL-3 et PCBP1 sont inversement corrélées dans de multiples types de cancers dont l'analyse a été effectuée par IHC et WB. PCBP1 n'inhibe que partiellement l'expression de PRL-3. (Wang et al. 2010).

2.3.3. Régulation et modifications post-traductionnelles

PRL-3 est une phosphatase soumise à de nombreux types de modification post-traductionnelles : phosphorylation, farnésylation, oxydation, oligomérisation. La quasi-totalité de ces modifications permettent la régulation de son activité catalytique, ou la modulation de sa distribution subcellulaire par la farnésylation. PRL-3 est une protéine phosphorylée sur les tyrosines 53 et 126 dans les cellules de cancer colorectal (Fiordalisi et al. 2013; Zeng et al. 1998). La phosphorylation de la tyrosine 53, qui est conservée entre les membres de la famille PRL, est phosphorylée par Src qui lui-même est activé par PRL-3 (Liang, Liang, et al. 2007). La phosphorylation de cette tyrosine, localisée non loin du site

actif semble essentielle aux effets pro-migratoires et pro-invasifs de PRL-3. La kinase impliquée et le rôle de la phosphorylation de la tyrosine 126 ne sont pas connus (Fiordalisi et al. 2013). L'activité de PRL-3 est bloquée par la formation d'un pont disulfure entre la cystéine catalytique 104 et une cystéine proximale (C49) en condition oxydative (Yu et al. 2007). La réduction des PRLs par la thiorédoxine TRP32 les protégeraient de l'oxydation et maintiendraient leur activité contribuant ainsi à la progression tumorale (Ishii et al. 2013). L'oligomérisation serait également une modification post-traductionnelle qui régulerait d'activité des PRLs. Cependant ces résultats sont contradictoires (Sun et al. 2007).

La stabilité de la protéine PRL-3 peut être modulée. La première étude portant sur la stabilité de PRL-3 s'intéresse à la protéine FKBP38 qui provoque la dégradation de PRL-3 par le protéasome (Choi et al. 2011). A l'inverse l'utilisation de petit ARN interférant anti-FKBP38 stabilise la protéine. Il a également été montré que PRL-3 participerait à une boucle de contrôle, dans laquelle son accumulation activerait l'autophagie et par conséquent PRL-3 serait dégradée (Huang et al. 2014). De plus, quatre lysines ont été révélées comme sites potentiels d'ubiquitinylation, par prédiction sur la base de la séquence en acide aminés (site BDM-PUB : <http://bdmpub.biocuckoo.org/>). Xing et al ont montré que la protéase USP4 qui clive l'ubiquitine de nombreux substrats interagit avec PRL-3 et diminue le niveau de son ubiquitinylation, prévenant ainsi sa dégradation dans les cellules cancéreuses (Xing et al. 2016). Un élément supplémentaire en ce sens, est la prédiction d'un peptide consensus de SUMOylation aux alentours de la lysine 125 et d'un site d'interaction de SUMO sur la séquence de la protéine PRL-3 humaine (site GPS-SUMO : <http://sumosp.biocuckoo.org/>) (Rubio & Köhn 2016).

L'expression de PRL-3, sa localisation et son activité sont régulées par des mécanismes à l'échelle de la transcription, de la traduction et post-traditionnellement. Comprendre comment PRL-3 peut être régulée est un objectif important afin (1) de mieux concevoir son rôle dans la progression des cancers, (2) de pouvoir inhiber son mécanisme et (3) influencer la progression métastatique des cancers dans lesquels PRL-3 est exprimée et la survie des patients.

2.4. L'inhibition de PRL-3 comme voie thérapeutique ?

Les découvertes mettant en évidence l'expression de PRL-3 dans une grande variété de cancers, et qui plus est sur son rôle dans l'acquisition de propriétés métastatiques des cellules tumorales, soulèvent l'intérêt des chercheurs pour le développement de molécules à effets thérapeutiques capables d'inhiber spécifiquement l'activité et/ou la localisation de cette phosphatase afin d'empêcher ou de traiter les métastases. Cependant 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 molécules inhibitrices de l'activité de PRL-3 ont été décrites :

Une première étude relate les effets inhibiteurs de la pentamidine (1,5-di(4-amidinophenoxy)pentane) sur 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. En ce même sens, la pentamidine provoque une réduction du volume tumoral d'un modèle murin de xénogreffe de mélanome (Pathak et al. 2002). 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 10 μ g/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 (Pathak et al. 2002). La pentamidine n'est pas spécifique des PRLs puisque son action inhibitrice a également été démontrée contre deux autres PTPs, qui sont PTP1B (Protein tyrosine phosphatase 1B) et DUSP1 (Dual-specificity phosphatase-1 aka MKP1) (Pathak et al. 2002), une phosphatase ciblant les MAPKs. À côté de son effet sur les phosphatases, la pentamidine inhibe (a) la protéine de liaison au calcium, S100B qui interagit avec p53 (Capoccia et al. 2015; Cirillo et al. 2015) et (b) l'activité nucléase de MRE11, une enzyme impliquée dans la réparation des cassures double brin et bloque la réparation de l'ADN (Kobayashi et al. 2010). La pentamidine est un antiparasitaire utilisé dans le traitement des leishmanioses ainsi que *Pneumocystis carinii* (Pathak et al. 2002) et est efficace dans des modèles de différents cancers incluant les carcinomes à cellules rénales (Zerbini et al. 2008) et le mélanome cutané (Smith et al. 2010). Ainsi, la pentamidine pourrait être proposée comme traitement aux patients atteints de cancers impliquant des taux élevés de PRL-3 (Kobayashi et al. 2010).

Des composés de synthèse, dérivés de rhodanine, présentent également le pouvoir 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 sur-exprimant 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'eitrine et de la kératine 8 (Min et al. 2013). Ces mêmes résultats sont obtenus avec l'émodine, un dérivé de l'antraquinone (Han et al. 2012). 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 (Ahn et al. 2006; Min et al. 2013) (Figure II.18).

Deux agents biflavonoïdes, le ginkgetine et le sciadopitysine, sont capables d'inhiber 80% de l'activité catalytique de PRL-3 *in vitro*, à une concentration de 100 μ g/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 autre, connue pour contenir la molécule active du paclitaxel (ou Taxol), qui est aujourd'hui utilisée comme agent anti-cancéreux 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) (Choi et al. 2006) (Figure II.18).

Le curcumin qui montre des effets anticancéreux diminue considérablement l'expression de PRL-3, sans affecter celle de PRL-1 et PRL-2 (Wang et al. 2009)

D'autre part, la thienopyridone inhibe efficacement et spécifiquement les PRLs *in vitro*. *In vivo*, la thienopyridone abolit la migration de cellules endothéliales HUVEC par le clivage de p130Cas (Daouti et al. 2008).

Par une approche de criblage faite à partir de la modélisation moléculaire de PRL-3 (Jeong et al. 2005), des composés de synthèse ont pu être identifiés comme molécules inhibitrices de PRL-3 (Park et al. 2008) (composé 5 : Figure II.18).

Une autre piste de régulation négative de PRL-3 serait d'empêcher sa localisation à la membrane plasmique. Il est clairement établi que l'intégrité de son motif de prénylation CAAX et son association à la membrane plasmique sont cruciaux pour que la phosphatase PRL-3 assure ses fonctions pro-migratoires et invasives (Zeng et al. 2000; Song et al. 2009). Ainsi empêcher la localisation membranaire de PRL-3 avec les inhibiteurs de farnésyltransférases (FTI), permettrait de contrecarrer ses effets dans la progression cancéreuse. La limite de ces composés est leur 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 (Konstantinopoulos et al. 2007)(Lerner et al. 1995). En revanche, ils ne se sont pas révélés efficaces en essais clinique de phase II notamment par compensation par géranylgeranylation de Ras.(Gajewski et al. 2012) (Figure II.18).

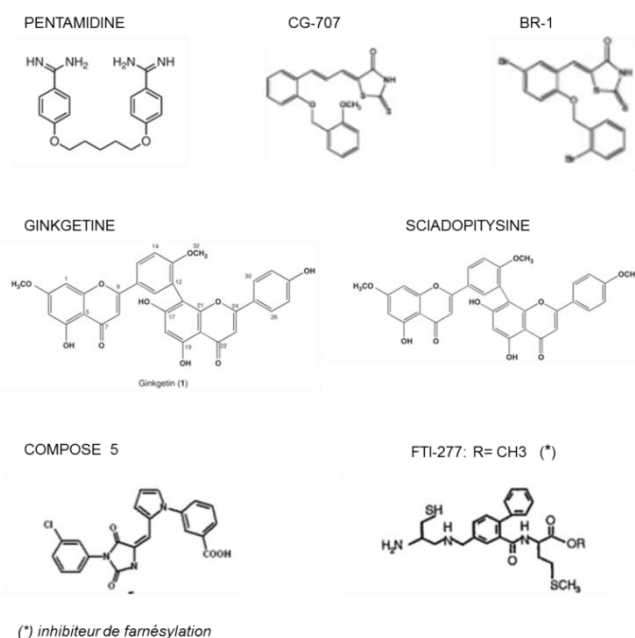


Figure II.18 : Structures chimiques de divers inhibiteurs de la phosphatase PRL-3. La modélisation moléculaire de PRL-3, réalisée à partir de structure cristalline de PRL-1, a permis d'identifier de nouveaux inhibiteurs potentiels de PRL-3 dont notamment le composé 5. L'ensemble de ces composés sont décrits dans la section (II) 2.4.

La migration cellulaire, comme elle vient d'être argumentée est le processus cellulaire par lequel PRL-3 agit majoritairement pour favoriser le développement pro-métastatique des cancers l'exprimant. En aval de sa localisation à la membrane plasmique PRL-3 régule directement ou indirectement diverses protéines membranaires ou associée à la membrane ayant des rôles distincts dans le processus migratoire des cellules cancéreuses. Parmi ces protéines, on compte entre autres, l'intégrine $\beta 1$ et l'eitrine qui sont des acteurs majeurs et fondamentaux de l'adhérence cellulaire. Mais également des protéines adaptatrices des structures d'adhérence telles que la paxilline et la vinculine, et des molécules effectrices telles que Rho et ERK1/2. Ces dernières sont impliquées dans le remodelage du cytosquelette d'actine et la migration cellulaire.

La troisième partie sera consacrée aux aspects moléculaires de la migration cellulaire, et aux deux familles d'acteurs clés, les intégrines et les métalloprotéases, de ce processus dans la mesure où j'ai consacré mes travaux de recherche à comprendre la dérégulation de ce mécanisme dans le contexte de PRL-3. Contrairement aux métalloprotéases je consacrerai une section entière aux intégrines (section III 4) car elles ont été au centre des mes travaux de recherche.

PARTIE III : Mécanismes Moléculaires de la Migration : implication des intégrines et des structures d'adhérence

1. Généralités sur la cascade métastatique

Dans le cas de nombreux cancers dont le mélanome uvéal, les métastases qui disséminent du site de la tumeur primaire aux sites secondaires à distance est un réel problème de santé puisqu'elles sont la principale cause de décès des patients atteints de cancers (90%) (Hanahan & Weinberg 2011). La dissémination métastatique est une cascade d'évènements qui commence en premier lieu par vascularisation de la tumeur, suit alors, la dissociation de certaines cellules de la tumeur primaire, qui ont acquis des propriétés pro-migratoires et pro-invasives leur conférant la capacité de migrer et d'envahir la lame basale, le stroma et les tissus adjacents à la tumeur. Ensuite, afin de se disperser au-delà du site primaire, les cellules doivent dégrader la lame basale des vaisseaux sanguins ou des vaisseaux lymphatiques. Ce procédé est appelé intravasation. Ces processus de migration et d'invasion font notamment intervenir des molécules d'adhérence, les intégrines, et des protéases incluant les métalloprotéases (MMPs). L'expression de ces deux acteurs dans les cancers est associée au potentiel invasif des cellules tumorales. Par voie sanguine ou lymphatique (dans le cas du mélanome uvéal il s'agirait préférentiellement de la voie hématogène), les cellules tumorales circulent jusqu'à atteindre l'organe à distance. Un autre critère important pour l'établissement des métastases est l'adhérence des cellules tumorales circulantes aux cellules endothéliales de l'organe ciblé, qui nécessite l'expression de protéines d'adhérence, incluant entre autres les intégrines. L'étape ultérieure est l'extravasation qui consiste à envahir l'endothélium, la lame basale, et le tissu de l'organe. La dernière étape de la dissémination métastatique est la prolifération des cellules métastatiques qui à ce stade correspond au développement de nouveaux foyers tumoraux (Figure III. 19).

2. Les différents modes de migration cellulaire

La migration est un processus commun à tous les types cellulaires. Il s'agit d'un phénomène fondamental de mouvement des cellules au sein de leur environnement qui se passe pour la première fois au cours du développement embryonnaire. Elle permet l'acheminement des cellules immunitaires vers les lieux d'infections, le processus de cicatrisation des tissus lésés, l'acheminement ou encore dans la dissémination métastatique des cellules tumorales invasives.

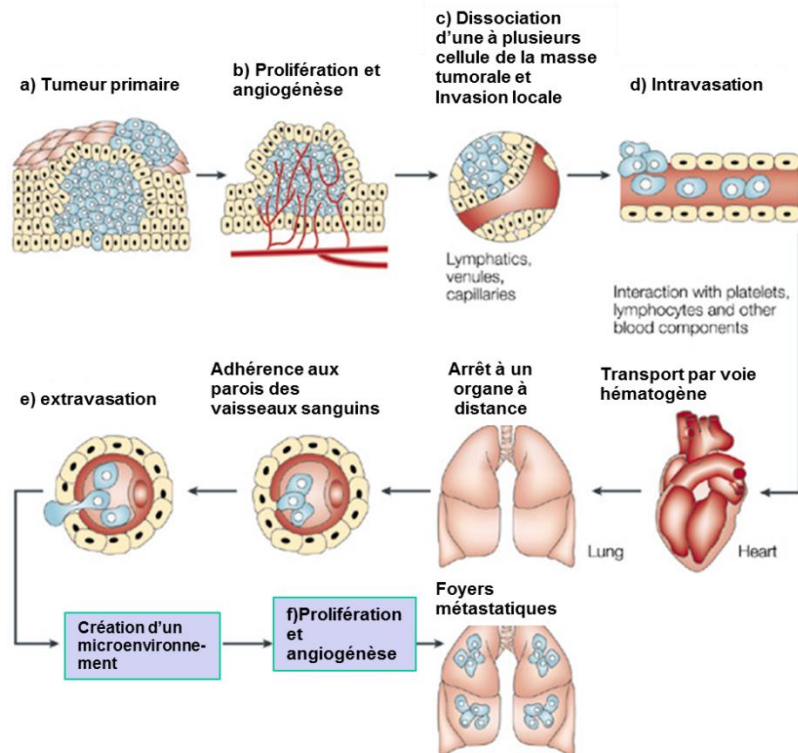


Figure III.19: Etapes de la cascade métastatique. La dissémination métastatique se fait selon un modèle en sept étapes. La première consiste en l'établissement d'une vascularisation (b) s'ensuit la dissociation de cellules et l'invasion de la lame basale (c), puis l'intravasation des vaisseaux sanguins ou lymphatiques (d). Les cellules circulantes dans le sang s'arrêtent ensuite au niveau d'un organe à distance, où elles sont piégées dans la microvasculature de l'organe ciblé. Elles dégradent les membranes qui protègent et maintiennent l'organe puis l'envahissent (e). Elles forment ensuite des micrométastases qui peuvent acquérir des capacités de colonisation et ainsi former des macrométastases. Figure et légende adaptée de (Friedl & Wolf 2003).

Il est établi que les cellules cancéreuses peuvent adopter différents modes de migration en fonction de leur type ou de leur morphologie. Les cellules peuvent ainsi migrer soit de manière individuelle, dans ce cas la migration peut-être mésoenchymateuse ou amiboïde, soit en groupe, on parle alors de migration collective (Figure III.20).

Dans le cas de la transformation des cellules épithéliales d'un état normal à un état cancéreux, les cellules subissent une perte d'expression des molécules d'interactions cellules-cellules (ex : cadhérines) au profit des marqueurs mésoenchymateux (ex : intégrines) et des signaux pro-migratoires et pro-invasifs, cela s'attribue au procédé de transition épithélio-mésoenchymateuse (TEM). Dans certains cas, les cellules individualisées mésoenchymateuses perdent leur capacité d'adhésion à la matrice extracellulaire (MEC) et migrent de manière amiboïde. Ces deux modes de migration sont interconvertibles et les cellules de carcinomes adoptent le mode adéquat de façon à s'adapter à leur microenvironnement. Dans d'autres cas, lorsque les cellules gardent leur capacité de jonction cellule-cellule, la migration se fait de manière collective (Friedl & Wolf 2010) (Figure III.20).

2.1. La migration collective

La migration collective est caractérisée par une migration coordonnée d'un groupe de cellules maintenues entre-elles par des jonctions intercellulaires adhérentes. Ce type de migration assure l'acheminement des cellules pour la formation et la régénération tissulaire. Elle est également requise lors de processus du développement tels que la morphogénèse et l'organogénèse (Sanz-Moreno and Marshall, 2010). Pour migrer de manière efficace les cellules doivent former une entité unique ce qui nécessite la coordination de l'activité de leur cytosquelette. La structuration du cytosquelette est définie en fonction de la position des cellules dans le corps et permet de générer un mouvement de migration coordonnée en réponses aux facteurs de la matrice extracellulaire (facteurs de croissance, chimiokines, interleukines...). Les cellules meneuses, localisées au front du corps, ont la particularité d'avoir une activité protrusive et adhésive importante qui permet de tracter les cellules suiveuses. Cette formation génère une migration polarisée. Dans le cas du cancer, ce mode de migration permettrait l'entrée des cellules dans le système lymphatiques, tandis que les cellules en migration individuelle entreraient plus facilement dans la circulation sanguine (Sanz-Moreno & Marshall 2010) (Figure III.20).

2.2. La migration mésenchymateuse et amiboïde

La migration individuelle mésenchymateuse se réfère à la migration utilisée par les fibroblastes et est caractérisée par une morphologie allongée des cellules. Elle constitue un moyen efficace pour la dissémination métastatique des cellules cancéreuses qui se sont dissociées de la tumeur primaire et sont engagées dans un processus de transition épithélio-mésenchymateuse. La migration des cellules utilisant ce mode est guidée par la formation de protrusions membranaires d'actine à l'avant de la cellule qui donne par ailleurs le sens du mouvement ; et la rétractation de l'arrière de la cellule. A l'avant de la cellule, qui se dit « front de migration », on distingue deux types d'extensions membranaires définies en fonction de leur morphologie et de l'organisation de l'actine : le lamellipode et le pseudopode. Les pseudopodes sont des structures fines et allongées formées par des filaments d'actine serrés et parallèles. Ils serviraient de senseurs pour explorer l'environnement extracellulaire. A l'inverse des pseudopodes, les lamellipodes sont des extensions larges et aplaties formées de filaments d'actine entrecroisés en réseau (Le Clainche & Carlier 2008). Durant la migration ou lorsque qu'une cellule est étalée, l'adhérence à la matrice extracellulaire (MEC) est permise au travers de points d'ancrage qui se forment continuellement au niveau des lamellipodes. *In vivo*, la migration a lieu essentiellement en trois dimensions (3D) et est associée à un haut degré d'adhérence, une forte activité protéolytique aux points d'ancrage à la MEC nécessaire à la dégradation et au remodelage de la matrice extracellulaire (Friedl & Wolf 2010) et par une vitesse de migration relativement lente (0,1 $\mu\text{m}/\text{min}$) (Ballestrem et al. 2001). Parmi les composants moléculaires des points d'ancrage à la matrice extracellulaire, également décrit comme des structures d'adhérence focale, on compte les intégrines et les métalloprotéases transmembranaires. Les intégrines interagissent avec la MEC et fournissent la traction nécessaire pour la migration. Pour leur part, les métalloprotéases contrôlent la dégradation de

la matrice. Ces deux molécules, ainsi que les différentes étapes de la migration cellulaire mésenchymateuse sont décrites ci-après.

A l'opposé de la migration mésenchymateuse, la migration amiboïde des cellules est rapide (2-30 $\mu\text{m}/\text{min}$ vs 0,1 $\mu\text{m}/\text{min}$) et se caractérise par la forme ronde des cellules qui ont la capacité à se déformer pour migrer à travers fibres protéiques de la MEC (Ballestrem et al. 2001). Contrairement à la migration mésenchymateuse, les cellules utilisant la migration amiboïde ne nécessitent pas d'ancrage à la MEC. La présence de points d'adhérence et l'action des protéases sont rares à inexistantes. La migration amiboïde peut se faire de deux façons. Selon le premier modèle, les cellules qui sont de morphologie ronde forment une boursouffure, connue sous le nom de bleb, et migrent grâce à une forte contractilité cellulaire dépendante du réseau d'actine corticale (Sanz-Moreno & Marshall 2010; Friedl & Wolf 2010). Le second modèle concerne les cellules légèrement plus allongées qui peuvent former des petites protrusions à l'avant de la cellule grâce à la polymérisation de l'actine.

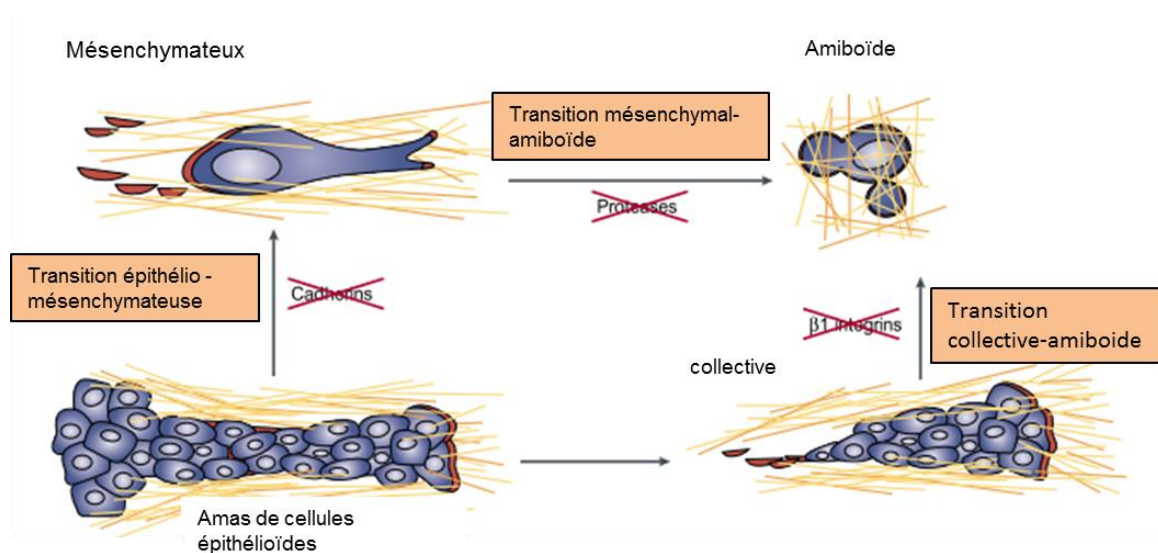


Figure III.20: Les différents modes de migration cellulaire. En fonction de l'environnement tumoral les cellules sont capables d'adapter leur morphologie (ronde ou mésenchymateuse) et leur profils (individuelle ou collective), par de modifications moléculaires afin d'adopter le mode de migration optimal à la situation. Ces modifications réversibles peuvent conduire à 1) une transition épithélio-mésenchymateuse, dans ce cas la masse cellulaire s'individualise par une perte d'expression des cadhérines et un gain d'expression des intégrines et de Snail. Les cellules peuvent adhérer à la matrice et migrer en faisant intervenir les intégrines et les protéases. 2) Les cellules qui perdent leur capacité d'adhérence et de dégradation de la matrice migrent de manière amiboïde (transition mésenchymal-amiboïde). Ce type de migration peut également résulter du blocage de l'intégrine $\beta 1$ par un anticorps anti-intégrine $\beta 1$. Suite à l'altération des jonctions cellules-cellules et de l'adhésion cellule/matrice extracellulaire, les cellules se détachent et adopte un mode de migration amiboïde indépendant des intégrines. Friedl, P. Wolf, K. 2003

3. Aspects moléculaires de la migration cellulaire individualisée

Les cellules cancéreuses qui se sont dissociées et individualisées de la tumeur et qui ont subi le processus de TEM et qui disséminent au-delà de la tumeur primaire suivent une mécanistique migratoire en cinq étapes qui s'enchainent de manière cyclique afin de permettre le mouvement de la cellule : 1) la formation de protrusions au front de migration, 2) l'interaction à la matrice extracellulaire et la formation de points focaux, 3) le recrutement des protéases et le remodelage de la matrice extracellulaire (MEC), 4) la contraction du corps cellulaire par l'actomyosine et 5) le détachement de la cellule par l'arrière (Friedl & Brocker 2000; Adams 2001) (Friedl & Wolf 2003) (Figure III.21.1, 21.2, 21.3, 21.4, 21.5). La régulation du remodelage des plaques d'adhérence focale et du cytosquelette d'actine constitue une part importante de la migration.

3.1. Modèle de migration mésenchymateuse des cellules individualisées

Les cellules qui ont entrepris un cycle de migration acquièrent la capacité de se déformer en réponse à l'environnement. Cette propriété permet à la cellule d'adopter une forme asymétrique et polarisée qui l'oriente dans le sens de la migration. La mise en place de cet axe de polarité et sa régulation sont gouvernées par des facteurs extracellulaires, qui influencent également l'évolution de la migration. Cette polarité contribue également au transport intracellulaire, à la division et à la différenciation des cellules (Ladoux et al. 2016; Inagaki & Katsuno 2017). Les cellules se polarisent en formant, à l'avant de la cellule un front de migration qui se caractérise par un assemblage du cytosquelette en une structure appelée un lamellipode et à l'arrière un uropode de composition moléculaire différente.

3.1.1. Formation des protrusions au front de migration

La polymérisation de l'actine en filament pousse la membrane cellulaire vers l'avant, en direction du sens de la migration et induit une force antérograde qui stabilise la cellule sur la MEC. En même temps, l'ensemble du réseau d'actine du lamellipode se déplace vers le centre de la cellule, générant ainsi une force rétrograde (membrane vers noyau) (Cramer 1997). La polymérisation de l'actine se fait par liaison avec le complexe ARP2/3, qui se lie à la protéine adaptatrice WASP (WASP, Wiscott-Aldrich syndrome protein). Le complexe ARP2/3/WASP s'associe aux phosphoinositides phosphates (PIPs) insérés dans la membrane plasmique et sert ainsi de point d'accrochage pour les filaments d'actine capable d'allonger la membrane et de former des protrusions. Par son interaction avec les filaments d'actine ARP2/3/WASP induit la formation d'un réseau d'actine. Les protéines GTPase de la famille Rho contribuent également à la migration cellulaire en régulant la morphologie de la cellule et la dynamique du cytosquelette. A titre d'exemple Cdc42 est impliqué dans la formation des filopodes

qui sont de longues extensions du cytosquelette servant à explorer l'environnement. Rac contribue à la formation des lamellipodes. Pour sa part Rho est impliquée dans la contraction de l'actomyosine et la formation des fibres de stress. Ces petites protéines GTPases sont activées par des facteurs d'échanges GEFs (facteurs d'échange du nucléotide guanine) qui, une fois liés aux PIP3 permettent l'échange du GDP en GTP. A l'inverse des GEFs, les GAPs (GTPases accelerating proteins) favorisent l'hydrolyse du GTP en GDP et ainsi l'inactivation des GTPases Rho, Rac et cdc42 (Friedl & Wolf 2003) (Figure III.21.1)

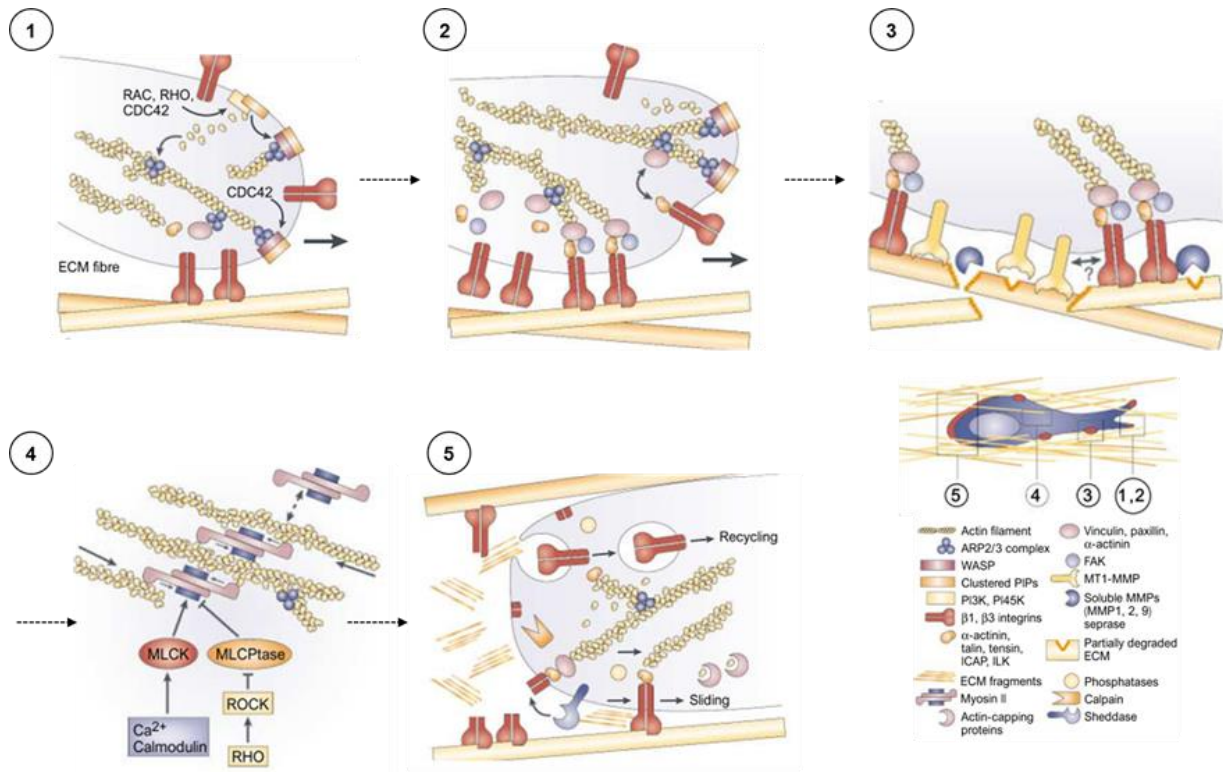


Figure III.21: Modèle de migration cellulaire selon un schéma en cinq étapes. 1) Formation des protrusions au front de migration. La grosse flèche représente le sens de migration. 2) Formation de points focaux. Interaction des intégrines avec la MEC et liaison avec le cytosquelette d'actine. Recrutement de protéines adaptatrices et régulatrices qui se lient sur la partie intracytoplasmique des intégrines. 3) Recrutement des protéases et protéolyse focale. Enrichissement de protéases au niveau des structures d'adhérence et dégradation des protéines de la MEC. 4) Contraction cellulaire par l'actomyosine. Le sens de la contraction est signalé par les flèches. 5) Détachement et rétractation de l'arrière de la cellule. Figure et légende adaptées de (Friedl & Wolf 2003)

3.1.2. Formation des structures d'adhérence focale

Durant la migration, suite à la formation des protrusions, des protéines d'adhérence transmembranaire, les intégrines, sont recrutées au niveau de la membrane plasmique. Elles vont rentrer en contact avec différents composants de la matrice extracellulaire, s'activer et s'agréger afin de servir de point d'ancrage aux filaments d'actine. Ainsi, elle serve de précurseur à la formation d'un

point focal (ou une plaque d'adhérence focale) qui permet de faire le lien entre le milieu extracellulaire et le cytosquelette (Figure III.21.2).

Les intégrines et les plaques d'adhérence focales seront décrites plus en détails dans la section 3 de cette partie car nous avons étudié leur régulation par PRL-3 dans le mélanome uvéal.

3.1.3. Recrutement des protéases aux points focaux

Pour migrer à travers le stroma et la membrane basale, les cellules tumorales doivent, en plus de l'adhérence et des forces exercées, dégrader et remodeler les composants de la MEC et des membranes basales (collagène IV, laminine, entactine et protéoglycanes) (Kalluri 2003). La lame basale constitue une barrière entre les différents tissus et son remodelage dans le contexte cancéreux induit une modification de la rigidité et de la densité qui permet la migration des cellules, qui n'est pas permise dans des conditions physiologiques. Sa rupture est considérée comme un marqueur histologique signe de l'invasion des carcinomes (Barsky et al. 1983). La formation d'invaginations cytoplasmiques riche en actine dans l'axe ventral des cellules serait un élément clé responsable de la rupture de la lame basale par la dégradation des protéines matricielles (Chen & Wang 1999). Ces structures, appelées invadopodes, sont observées dans de nombreuses lignées cellulaires de cancers métastatiques (Hoshino et al. 2013). Depuis leur identification dans les cellules cancéreuses, les invadopodes ont été largement étudiés *in vitro*, ceci comprenant l'étude de leur composition et de leur formation. Parmi la centaine de molécules qui les composent, on compte la métalloprotéase MT1-MMP encore connue sous le nom de MMP14 et les intégrines $\beta 1$ et $\beta 3$. *In vivo*, la grande majorité des études permettant d'approfondir les connaissances des mécanismes moléculaires impliqués dans l'invasion de la lame basale se font dans *Caenorhabditis elegans* en raison de la simplicité d'étude sur ce modèle, qui possède des gènes orthologues à ceux qui codent les composants de la lame basale des vertébrés (Sherwood 2006; Hastie & Sherwood 2016).

La rupture des fibres protéiques denses, comme dans le cas de la lame basale, nécessite le recrutement de protéases au front de migration et leur sécrétion dans l'environnement extracellulaire où elles clivent de façon spécifique des composants de la MEC. 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 (Friedl & Wolf 2003) (Figure III.21.3). Les MMPs constituent la grande famille de 25 protéases majoritairement impliquées dans le remodelage de la MEC (Poincloux et al. 2009). En fonction de leur homologie de séquence, leur spécificité de substrats et leur localisation subcellulaire elles peuvent être divisées en sous-groupes qui sont les collagénases, les gélatinases, les matrilysines et autres. A titre d'exemple les membres MMP2 et MMP9 sont des gélatinases qui possèdent une forte affinité pour le collagène IV, un composant majeur des lames basales (Rolli et al. 2003). Le dernier sous-groupe, les MT-MMPs, comprend six membres qui ne sont pas sécrétés dans le milieu interstitiel mais qui sont ancrés dans la membrane plasmique. Les MMPs partagent une structure à multi-domaines formée d'un peptide signal amino-terminal, d'un pro-domaine et d'un peptide catalytique (Nagase et al. 2006). Elles sont synthétisées sous forme de zymogène inactifs (proMMPs) dont l'activation nécessite le clivage protéolytique du pro-domaine. Le

contrôle de l'activité des MMPs est réalisé par leurs inhibiteurs physiologiques, les TIMP (tissu inhibitors of metalloproteinases), qui dans certains cas peuvent également contribuer à leur activation. L'association de TIMP2 avec un homodimère MT1-MMP/MMP14 permet en effet le clivage et donc l'activation de MMP2 ou MMP13 (Butler et al. 1998).

Dans des conditions physiologiques normales, l'expression, la sécrétion et l'activité des MMPs sont finement régulées. En revanche la perte de contrôle de ces protéases peut-être associée à des processus de prolifération ou de remodelage tissulaire qui caractérisent notamment les cellules cancéreuses. Les mécanismes qui conduisent d'une part au recrutement et à la localisation des MMPs aux zones adéquates de la membrane plasmique et d'autre part à leur activité protéolytique sont encore partiellement méconnus. Cependant les intégrines localisées aux points d'adhérence pourraient contribuer au recrutement des MMPs, ce qui pourrait affecter la signalisation intracellulaire, faciliter leur activation et favoriser la migration cellulaire par le désassemblage des plaques d'adhérence, l'internalisation et le recyclage des protéines membranaires. Des interactions entre certaines intégrines et MMPs ont par ailleurs été observées dans des calvéoles membranaires, au front de migration des cellules en mouvement là où sont localisées les structures d'adhérence et dans des invadopodes. L'activité protéolytique des MMPs est nécessaire au niveau de ces deux dernières structures. La première interaction entre une intégrine ($\alpha V\beta 3$) et une MMP (MMP2) a été mise en évidence à la surface de cellules de mélanomes cutanés et de vaisseaux sanguins néoformés (Brooks et al. 1996). Ce complexe a été identifié comme nécessaire pour la croissance tumorale et l'angiogénèse *in vivo* (Brooks et al. 1998). Autrement, la coopération entre l'intégrine $\alpha V\beta 3$ active et MMP9 augmente la migration des cellules de cancers du sein métastatique (Rolli et al. 2003). De même MMP14 interagit et coopèrent avec les intégrines $\alpha V\beta 3$ et $\beta 1$ dans la promotion de la migration de cellules endothéliales (Gálvez et al. 2002). MMP14 et l'intégrine $\beta 1$ sont souvent co-localisées et coopèrent aux extrémités des protrusions cellulaires qui permettent l'adhérence et la dégradation de la MEC.

La coopération MMPs/intégrines semblent réellement contribuer au processus métastatique puisque l'inhibition du complexe intégrine $\alpha V\beta 3$ /MMP2 soit par une molécule organique (TSRI625) soit par un fragment non-catalytique de la MMP2 (Brooks et al. 1998; Silletti et al. 2001; Pfeifer et al. 2000) induit une diminution de l'angiogénèse dans un modèle *in vivo*. Outre qu'interagir avec les MMPs, les intégrines contribuent également à la sécrétion et l'activation de ces protéases ce qui pourrait expliquer, en partie, pourquoi la coopération de ces deux protéines au niveau des points d'adhérence favorise la migration des cellules cancéreuses. Par exemple, $\alpha V\beta 3$ qui induit l'expression de MMP2 dans des cellules de mélanome cutané (Brooks et al. 1996). Un autre exemple montre que l'interaction $\alpha 5\beta 1$ /fibronectine induit l'expression et l'activation des MMP2 et MMP9 dans une lignée cellulaire de cancer du sein MCF-7 et du col de l'utérus (Das et al. 2008; Maity et al. 2010). L'activation des MMPs peut donc être médiée par les intégrines (Brooks et al. 1996; Brooks et al. 1998; Gálvez et al. 2002). Depuis différentes autres associations intégrines/MMPs ont été rapportées suggérant une coopération de ces deux protagonistes dans la migration et l'invasion des cellules tumorales (Stefanidakis & Koivunen 2006). Dans certains cas l'activité des MMPs n'est pas nécessaire à la migration. Par exemple, dans des matrices 3D de collagène I *in vitro*, il a été montré que l'activité protéasique de MMP14 est nécessaire lorsque la matrice est dense, mais dans une matrice lâche l'interaction avec

l'intégrine $\beta 1$ suffit à induire la migration des cellules de l'épithélium mammaire de souris (Mori et al. 2013). Ceci suggère qu'en fonction de l'environnement extracellulaire les cellules pourraient migrer le long de protéines fibrillaires en exerçant des forces générées par l'actomyosine sans dégrader la MEC.

3.1.4. Contraction cellulaire par l'actomyosine

L'actomyosine est la résultante de l'association des filaments d'actine et de la myosine II. Cette dernière sert de moteur moléculaire pour la contraction des filaments et est régulée par la protéine Rho et la kinase MLCK (myosin light-chain kinase). L'extension de la protrusion à l'avant de la cellule s'arrête dès que la cellule a rencontré une autre cellule ou qu'elle se divise. Ce phénomène est sous le contrôle de la myosine II. Le calcium et la MLCK phosphoryle la chaîne légère de la myosine (myosin light-chain, MLC) qui active la myosine II aboutissant ainsi à la contraction de l'actine et à la formation de fibre de stress. La formation de fibre de stress est contradictoire avec l'élongation des protrusions et empêche la migration cellulaire. Des systèmes de régulation négatif de la contraction existent, et implique notamment la phosphatase de la MLC (MLCptase). MLC peut également être activée par la kinase ROCK. Rho A active ROCK qui inhibe la MLCptase par phosphorylation. Cette inhibition permet de conserver la phosphorylation de la MLC et de favoriser l'assemblage des filaments d'actine en fibre de stress. La contraction cellulaire induite par l'actomyosine génère les forces nécessaires au mouvement du corps cellulaire et au désassemblage des plaques d'adhérence à l'arrière des cellules. Au front de migration, la polymérisation de l'actine crée une force rétrograde (de la membrane vers le noyau) contraire à la force antérograde (du noyau vers membrane) générée par l'assemblage des filaments depuis le centre de la cellule. Le croisement de ces deux forces forme une zone de convergence où les fibres d'actine sont immobiles. De ce fait, la migration nécessite donc également la capacité des cellules à réguler cette dynamique du réseau d'actine (Friedl & Wolf 2003) (Figure III.21.4).

3.1.5. Détachement et rétraction 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. Il semble que plusieurs mécanismes soient impliqués dans ce procédé. L'une des hypothèses est que le détachement soit dû aux forces générées par l'actomyosine qui fragilise l'association intégrine/substrat. En effet, des fibroblastes déficients en myosine IIA ont montré des défauts de désassemblage des structures d'adhérence et de détachement de l'arrière de la cellule. La protéolyse des composants de plaques d'adhérence contribuerait également à la rétraction par l'action des calpaïnes, ce qui causerait la destruction de ces plaques. Il a été mis en évidence que la kinase FAK pourrait également participer au désassemblage des plaques ou encore qu'il y aurait un changement dans l'organisation de la matrice extracellulaire qui ne permettrait plus l'interaction intégrine/MEC. A la suite du désassemblage des plaques, les intégrines seraient internalisées par endocytose et recyclées au front de migration pour commencer un nouveau cycle de migration (Friedl & Wolf 2003).

4. Les intégrines dans l'adhérence et la migration cellulaire

Le microenvironnement cellulaire, c'est-à-dire l'environnement local des cellules est composé de facteurs solubles (chimiokines, facteurs de croissances) et insolubles (protéines de la MEC) qui peuvent réguler la migration cellulaire (Liotta & Kohn 2001). Les cellules migrent donc en réponse aux stimuli qui proviennent de l'environnement cellulaire et sont réceptionnés par les récepteurs exprimés à la surface des cellules. Parmi ces récepteurs on compte les molécules d'adhérence qui assurent l'association cellule/matrice et cellule/cellule. Il existe plusieurs familles de molécules d'adhérence qui sont les intégrines, les cadhérines, les sélectines, et les immunoglobulines. Dans ce manuscrit, je décrirais uniquement les intégrines puisqu'il s'agit de la famille de récepteurs étudiée durant ma thèse.

4.1. Les intégrines

Les intégrines sont des glycoprotéines transmembranaires permettant l'ancrage des cellules entre-elles ou à la matrice extracellulaire. Les intégrines constituent une famille de récepteurs répandue puisqu'on les retrouve à la surface de toutes les cellules eucaryotes. Les intégrines intègrent la matrice extracellulaire avec le cytosquelette d'actine, d'où leur appellation en « intégrine » (Hynes 1987). Elles participent également aux interactions cellules-cellules et permettent l'activation de nombreuses voies de signalisation qui explique leur implication dans des processus cellulaires comme la survie, la prolifération ou encore la migration. Malgré l'émergence de ce sujet depuis la fin des années 80, les intégrines restent encore à ce jour un vaste sujet d'étude avec plus 2500 publications par an (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/insb.bib.cnrs.fr/pubmed/?term=Integrin>). Dans la suite de cette partie je décrirai succinctement le rôle des intégrines dans l'adhérence et la migration des cellules cancéreuses. Les intégrines participent à la migration par la formation des points d'adhérence et le recrutement des protéases au front de migration. Elles favorisent également la réorganisation du cytosquelette d'actine en activant la famille des Rho GTPases parmi lesquelles on compte Rac, Cdc42 et Rho.

4.1.1. Diversité des intégrines

Les intégrines sont des hétérodimères formés d'une des 18 sous-unités α et d'une des 8 sous-unités β capables de s'associer de manière non-covalente en 24 hétérodimères chez l'homme (Figure III.22). Les intégrines peuvent être regroupées en sous-familles soit selon leur composition en sous-unité $\alpha\beta$ soit en fonction de la nature de leur ligand. Certains ligands présentent une séquence RGD (où R représente l'arginine, G la glycine et R l'acide aspartique) reconnue par 8 couples d'intégrines. Celle-ci est présente dans environ un tiers des ligands liant les intégrines et comprend la fibronectine, la vitronectine et le fibrinogène. Le collagène est reconnu par 4 hétérodimères d'intégrines à sous-unité β_1 grâce à la présentation de sa séquence GFOGER (Hynes 2002). De plus, les intégrines ont des

profils d'expression différents qui varient en fonction de la différenciation cellulaire, de l'environnement ou de leur activation. Certaines isoformes peuvent être restreintes spécifiquement à un type tissulaire ou cellulaire, ce qui leur confère une spécificité de liaison aux protéines de la MEC (Figure III.22). A titre d'exemple, les intégrines $\beta 2$ et $\beta 7$ font parties du lignage leucocytaire alors que l'expression de l'intégrine $\beta 1$ est répandue à plusieurs types cellulaires. Le répertoire d'intégrines d'une cellule donnée dicte la manière dont la cellule adhère et migre fonction de leur affinité pour les différentes matrices (Margadant et al. 2011).

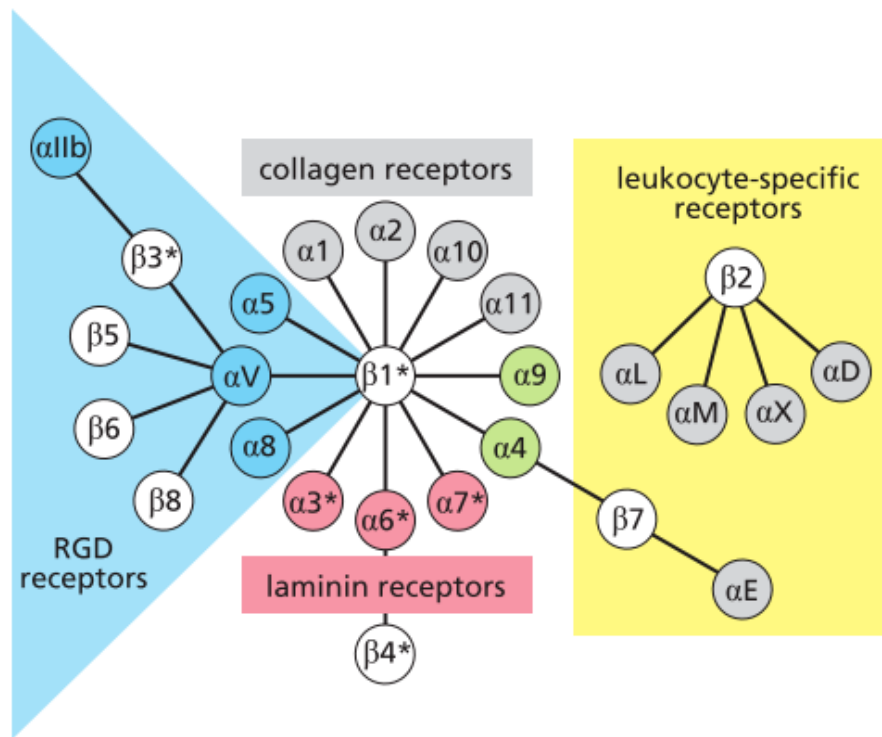


Figure III.22: Classification des différents hétérodimères d'intégrines et leurs ligands. Les différentes combinaisons d'hétérodimères possibles sont reliées par un trait. Les dimères d'intégrines peuvent se lier à différents ligands: le collagène, la laminine, les protéines contenant un domaine RGD et des ligands spécifiques aux intégrines exprimées à la surface des leucocytes. Les ligands pour ces dernières incluent: la E-cadhérine, le fibrinogène, le facteur x, le facteur complémentaire inactif 3b (CFI 3b), la protéine d'adhérence aux cellules vasculaires 1 (VCAM-1) et le facteur de von Willebrand. Les protéines à domaine RGD comprennent la fibronectine, la vitronectine, la néphronectine etc... Figure d'après (Weineberg 2014)

4.1.2. Structure des intégrines

Les sous-unités α et β n'ont pas d'homologie de séquence et sont donc totalement distinctes. Les sous-unités α atteignent une homologie d'environ 30% et l'homologie est $\sim 45\%$ dans le cas des sous-unités β (Takada et al. 2007) (Hynes 2002).

Les chaînes des sous-unités α et β s'associent dans le réticulum endoplasmique où elles subissent des modifications post-traductionnelles (glycosylation) avant d'être transloquées à la membrane plasmique. Des sous-unités libres au niveau de la membrane plasmique ne sont pas observées.

Les sous-unités α des intégrines sont constituées d'environ 940-1140 acides aminés ce qui correspond à une masse moléculaire d'environ 120 kDa-180 kDa. Elles possèdent une large partie amino-terminale extracellulaire constituée d'au moins sept segments répétitifs en feuillet β qui forment la tête globulaire, suivis par un domaine « Thigh », « calf 1 » et « calf 2 » qui ensemble forment la jambe. La moitié des sous-unités α (α_1 , α_2 , α_{10} , α_{11} , α_D , α_X , α_M , α_L et α_E) possède un domaine additionnel « I » de 200 acides aminés qui sert de site de fixation au ligand. La partie transmembranaire se compose d'une unique hélice transmembranaire. La partie cytoplasmique est courte (20-50 acides aminés) et possède une séquence juxtamembranaire très conservée (GFFKR) nécessaire à l'hétérodimérisation des deux sous-unités (Figure III.23 et 24) (Campbell & Humphries 2011).

Les sous-unités β des intégrines sont plus petites que les sous-unités α , elles ont une masse moléculaire d'environ 90-110 kDa, en excluant les modifications post-traductionnelles. La partie extracellulaire se compose d'un domaine I, semblable à celui des sous-unités α , de quatre domaines répétés de type EGF (Epithelial Growth factor), d'un domaine hybride, d'un domaine PSI (plexin-semaphorin-integrin) et d'un domaine proximal à la membrane, le domaine β_{TM} (β tail motif) (figure III.23).

De manière identique aux sous-unités α , le domaine transmembranaire se forme d'une courte hélice α d'environ vingt résidus. La partie carboxyterminale cytoplasmique est courte (15-65 acides aminés), hormis pour l'intégrine β_4 (figure III.23) pour laquelle elle approche des 1000 acides aminés. Cette partie contient trois motifs de phosphorylation conservés qui servent de site de fixation à un grand nombre de protéines adaptatrices. Au plus proche de la membrane se trouve le motif NPxY suivi par le motif S/T, et le motif NxxY dans la région la plus éloignée de la membrane (Figure III.24). A l'inverse des récepteurs à tyrosine kinase, les intégrines ne possèdent pas d'activité catalytique cependant leur activation engendre le recrutement et l'activation de protéines adaptatrices et régulatrices portant un domaine PTB (phosphotyrosine binding) qui interagissent au niveau des deux motifs NPxY /NxxY (Margadant et al. 2011).

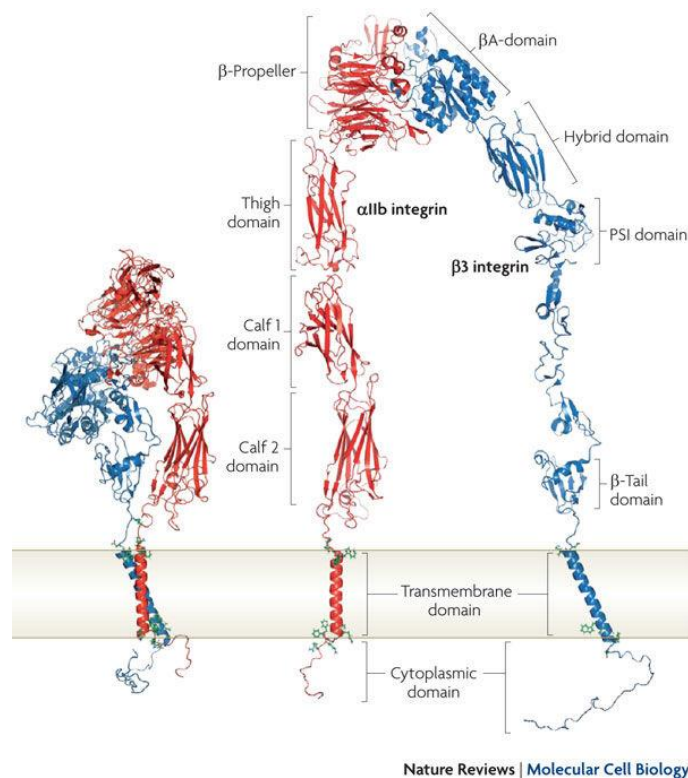


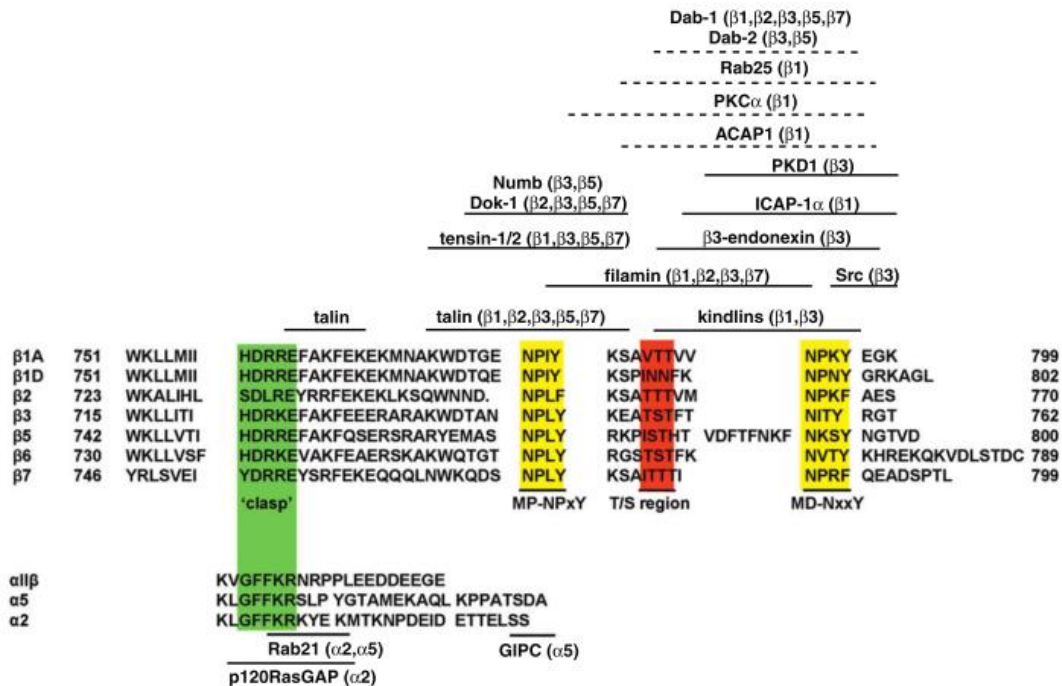
Figure III.23: Structure des différents domaines de l'intégrine $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$. Représentation de la structure de l'intégrine $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ en conformation repliée ou courbée qui correspond à la forme inactive, et en conformation dépliée, c'est-à-dire sous sa forme active. La sous-unité α est représentée en rouge et la sous-unité β en bleu. Figure issue de (Shattil et al. 2010)

4.1.3. Activation des intégrines

Le mécanisme d'activation des intégrines décrit ci-dessous concerne principalement les cellules sanguines, car, bien que nous sachions que leur comportement diffère de celui des cellules adhérentes, la plupart des études ont été réalisées sur des modèles de cellules sanguines.

L'activation des intégrines est contrôlée par les changements conformationnels qui s'opèrent au niveau des domaines extracellulaires et intracellulaires des sous-unités α et β en fonction de leur affinité pour le ligand: l'hétérodimère d'intégrine peut adopter 1) une conformation courbée qui correspond à l'état au repos ou de « faible affinité » 2) une conformation intermédiaire où la partie extracellulaire est ouverte mais inactive et 3) une conformation ouverte de haute affinité qui se lie au ligand (Margadant et al. 2011). Le passage à la conformation de haute affinité nécessite de rompre le pont salin qui maintient l'interaction entre les queues cytoplasmiques des deux sous-unités. La tête de l'intégrine passe alors d'une position proche de la membrane, à une position étendue rendant possible l'interaction avec le ligand (figure III.23). Ces changements conformationnels relatifs à l'état d'activation de l'intégrine peuvent-être provoqués par une signalisation « inside-out » faisant intervenir des composants intracellulaires. En plus de son rôle mécanique dans l'adhérence à la

matrice, les intégrines transmettent des signaux à la cellule sur la base des facteurs extracellulaires (localisation, l'environnement local et la MEC...). Les signaux de cette signalisation « outside-in » déterminent la réponse cellulaire à adopter. (Figure III.25).



Current Opinion in Cell Biology

Figure III.24: Séquence des queues cytoplasmiques des sous-unités β1A, β1D, β2, β3, β5, β6 et β7. Les séquences de β4 et β8 ne sont pas présentées car elles ont une faible homologie de séquences avec les autres isoformes. Les nombres indiquent le rang du premier et dernier résidu de cette portion de séquence. L'encadré vert montre la séquence engagée dans la formation du pont qui maintient l'hétérodimère d'intégrine dans une conformation de faible affinité. Les encadrés jaunes indiquent le motif NPXY en position proximale par rapport à la membrane, qui contient la tyrosine 783 et le motif NxxY en position distale. L'encadré rouge indique la région sérine/thréonine S/T qui contient les thréonines 788 et 789. Sont indiqués les sites de fixation des régulateurs de l'activation des intégrines tels que la taline, la kindline, la filamine, ICAP et Src ...Figure et légende d'après (C. margadant et al 2011)

La régulation de l'affinité de l'intégrine pour son ligand est régulée par l'activation « inside-out, qui met en jeu les partenaires des intégrines tels que la taline et la kindline. La taline possède un domaine FERM (4.1 Ezrine, Radixine, Moesine). La liaison de ce domaine FERM au motif NPXY de la queue cytoplasmique, la taline induit des changements de conformation qui modifient l'affinité du site de liaison de l'intégrine avec son ligand, permettant ainsi son activation (Wehrle-Haller 2012). Le rôle central de la taline dans l'activation des intégrines *in vivo* a été mis en évidence dans des modèles murins transgéniques qui ont révélé l'importance de l'interaction taline/intégrine pour l'agrégation des plaquettes (Nieswandt et al. 2007; Petrich et al. 2007). Cette signalisation requiert également la fixation de la kindline sur le motif NxxY pour l'activation des intégrines (Moser et al. 2008) (Legate & Fässler 2009). En effet, il a été montré que des leucocytes dépourvus de l'isoforme 3 de la kindline ne

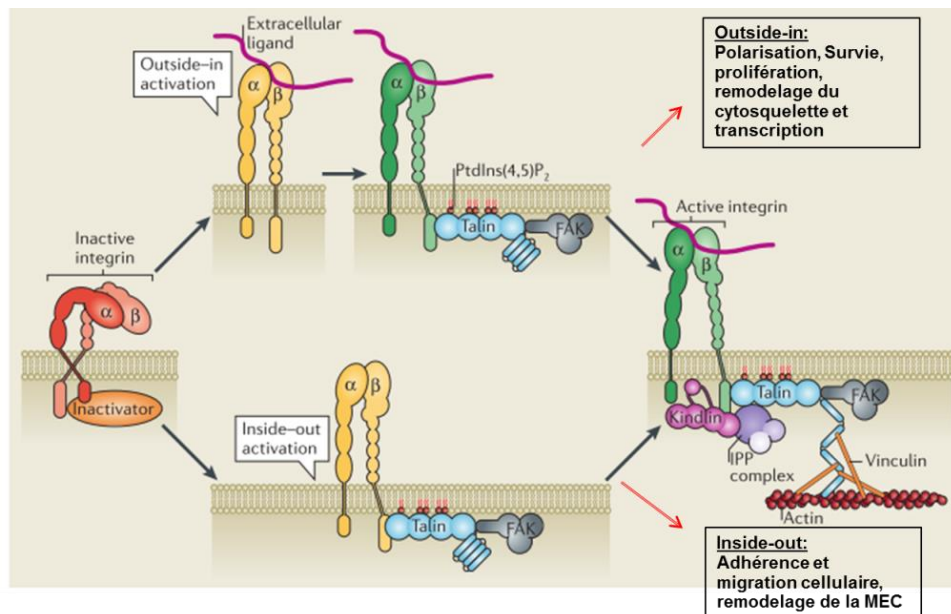


Figure III.25: Activation des intégrines. Dans les cellules, les intégrines existent sous trois conformations qui reflètent leur état d'affinité pour le ligand: la conformation repliée de faible affinité, la conformation ouverte mais inactive (état intermédiaire) et la conformation ouverte et active, qui correspond à un état de haute affinité pour le ligand. Les intégrines sont dans une conformation active quand elles sont liées à la matrice extracellulaire et au cytosquelette d'actine. L'activation inside-out est dépendante de la fixation des protéines intracellulaires sur la partie cytoplasmique de l'intégrine. La taline et la kinase FAK font partie des premières protéines recrutées par les intégrines. S'ensuit le recrutement de nombreuses protéines qui intégreront le complexe pour former une structure d'adhérence et une plateforme de signalisation. L'activation outside-in est soumise aux contrôles des facteurs extérieurs. La fixation du ligand induit une transition de la conformation repliée à une conformation ouverte du domaine I-like de la sous-unité β. Figure et légende adaptées de (Bouvard et al. 2013)

peuvent adhérer aux cellules endothéliales ce qui reflète un défaut d'agrégation et d'activation des intégrines (Nieswandt et al. 2007; Petrich et al. 2007; Moser et al. 2008; Legate & Fässler 2009). Zhang et al montrent également que des cellules mutantes pour les isoformes 1 et 2 de la taline ont un défaut de formation des plaques d'adhérence focales et d'étalement (Zhang et al. 2008). Ces résultats suggèrent donc que l'expression de ces deux protéines est cruciale pour l'activation et l'agrégation des intégrines afin de déclencher la formation de foyers d'adhérence et par conséquent de permettre l'adhérence et l'agrégation des plaquettes *in vivo*.

L'interaction de la taline et de la kindline aux motifs NPxY/NxxY est hautement dépendante de l'état de déphosphorylation de ces motifs (Anthis et al. 2009; Bledzka et al. 2010). Bledzka et al ont en effet montré que la phosphorylation du motif NxxY de l'intégrine β₃ (NITY) empêche la fixation de la kindline 2 et l'activation du récepteur (Bledzka et al. 2010). En ce sens, il a été suggéré que la phosphorylation des résidus tyrosines qui survient après la fixation du ligand, inhibent la fixation de la taline au profit de la fixation de la tensine et de DOCK 1 (Dedicator Of Cytokinesis 1), deux régulateurs négatifs de l'activation des intégrines. En effet, un phospho-mutant de l'intégrine β₃ (Y>F) induit un défaut d'agrégation plaquettaire, et un saignement abondant synonyme d'un défaut d'adhérence des cellules (Law et al. 1999).

- Ceci suggère que la déphosphorylation des motifs NPxY/NxxY est essentiel à l'activation des intégrines.

A l'opposé de l'activation, plusieurs protéines peuvent participer à l'inhibition de l'activation des intégrines par compétition avec la taline pour la fixation sur les motifs de la queue cytoplasmique (Nieves et al. 2010; Kiema et al. 2006). Entre autres il est connu que le site de fixation de la taline chevauche le site de fixation de la filamine, un régulateur négatif des intégrines (Margadant et al. 2011). Il a été montré que la phosphorylation du motif NPxY par Src inhibe la fixation de la taline et favorise l'affinité de la filamine pour ce motif. Par ailleurs, la phosphorylation de la région S/T contribue également à la fixation de la taline, et à l'activation des intégrines au détriment de la fixation de la filamine qui est associée à la déphosphorylation de ces résidus et à l'inactivation de l'intégrine (Kiema et al. 2006). En effet la phosphorylation de la région S/T soit par la fixation d'un agoniste ou possiblement par la PKC, inhibe la fixation de la filamine sans affecter la fixation de la taline.

- La mutagenèse des résidus du motif S/T des intégrines $\beta 1A$ et $\beta 3$ par des acides-aminés non phosphorylables provoque une inactivation des intégrines et induit une diminution des capacités d'adhérence. Ceci suggère que la déphosphorylation de ce motif est essentiel à la désactivation des intégrines (Margadant et al. 2011) (Nilsson et al. 2006; Wennerberg et al. 1998; Flanigan et al. 2009).

Outre la filamine, la fixation des protéines régulatrices DOCK1 et ICAP1 (Integrin Cytoplasmic domain-Associated Protein-1), via leur domaine PTB sur les motifs NPxY et NxxY des sous-unités β ou des protéines SHARPIN et MDGI /FABP3 (mammary-derived growth inhibitor/Fatty Acid Binding Protein 3) sur les sous-unités α participent également au maintien des intégrines à l'état inactif (Chang et al. 1997; Oxley et al. 2008; Rantala et al. 2011; Nevo et al. 2010).

L'interaction des protéines activatrices sur la queue cytoplasmique des sous-unités β induit des changements conformationnels des domaines intracellulaires et extracellulaires, favorisant ainsi l'affinité pour les ligands. L'interaction d'un dimère ou d'un petit agrégat d'intégrines aux ligands crée, par l'intermédiaire avec la taline, un pont entre le cytosquelette d'actine et la MEC ; et secondairement, des forces qui contribueraient au renforcement de la liaison cytosquelette/MEC et le recrutement de nombreuses molécules de signalisation et du cytosquelette au niveau de la queue cytoplasmique des intégrines. C'est au travers de cette activation outside-in que la signalisation des intégrines déclenche les voies de signalisation cellulaires impliquées dans la différenciation, la prolifération, la survie et la migration (Figure III.25). Parmi les protéines recrutées on identifie des protéines régulatrices telles que les kinases FAK (focal adhesion kinase) et Src; des protéines effectrices telles que Rho et la PI3K mais également des protéines adaptatrices qui lient les filaments d'actine et incluent la paxilline, α -actinine et la tensine et la vinculine (Schwartz 2001). Le recrutement de ces protéines permet la maturation de la structure qui devient plus grosse et est appelée plaque d'adhérence focale (voir section 4.2.2) (Margadant et al. 2011).

4.1.4. Signalisations médiées par les intégrines

FAK est une enzyme cytoplasmique soluble clé de la signalisation médiée par les intégrines qui contribue au renouvellement des structures d'adhérence, à l'activation des GTPases de la famille Rho, à la migration cellulaire des cellules saines et cancéreuses (Mitra & Schlaepfer 2006). Elle est au centre de la plateforme de signalisation des intégrines. Lorsque les intégrines sont agrégées, FAK se fixe sur leur partie cytoplasmique et s'active par autophosphorylation de la tyrosine 397. Une fois activée, FAK recrute et phosphoryle des protéines à domaines SH2 telle que la kinase de la famille Src (SFK, Src kinase family), qui à son tour induit la signalisation des voies PI3K et MAPK. Par son interaction avec FAK, Src change de conformation et s'active. Elle va alors phosphoryler FAK sur plusieurs tyrosines, dont la tyrosine 925 qui crée un site de fixation pour Grb2. Le complexe Src/FAK permet également l'activation de Sos et de PLC γ , qui comme Grb2, mènent à l'activation de la voie MAPK/ERK. D'autre part, il peut recruter Cas et Crk, des molécules adaptatrices, qui activent Rac1 en amont de la voie MAPK/JNK (Guo & Giancotti 2004). FAK peut également activer directement la voie PI3K et mener à l'activation d'AKT. Ces voies convergent vers le noyau et mènent à la régulation de gènes impliqués dans la migration, la prolifération et la différenciation. FAK/Src contribuent également au remodelage du cytosquelette par l'activation des GTPase de la famille Rho. L'activation des GTPase Rho est médiée par les GEFs, qui catalyse l'échange du GDP en GTP. En réponse à l'interaction cellule/matrice, Rac est activée par la GEP DOCK180-ELMO (Lu M et Ravi 2006) qui elle-même a été activée en aval de la paxilline et de p130cas (zaidel bar R 2005). Les GEFs impliqués dans la catalyse de RhoA incluent p115RhoGEF (ou ARHGEF1 chez la souris), LARG (ou ARHGEF2 chez la souris et p190RhoGEF (ou RGNEF) (Dubash et al. 2007; Lim et al. 2008). La sous-expression de ces facteurs dans des cellules adhérentes à une surface de fibronectine, induit une diminution de l'activation de RhoA qui s'accompagne par conséquent d'une inhibition de la formation des fibres de stress. L'activation de Rho est contre-balançée par des GAPs telles que p190RhoGAP (Bass et al. 2008) et GRAF (Hildebrand et al. 1996) qui sont sous le contrôle de FAK et Src (Lim et al. 2008; Schober et al. 2007)(Figure III.26).

Concernant l'implication de FAK dans l'adhérence et la migration, plusieurs études ont montré que des cellules dépourvues de FAK présentent un défaut d'étalement et une augmentation du nombre de FA, conduisant à une diminution de la vitesse de migration (Ilić et al. 1995; Owen et al. 1999; Schlaepfer et al. 2000)(Ilić et al. 1995; Owen et al. 1999; Reinhold et al. 2008), alors que sa surexpression dans des cellules CHO accroît les capacités migratoires (Cary et al. 1996). Le remodelage des structures d'adhérence opérant pendant le processus de migration requière non seulement l'activation de FAK mais également son interaction avec ses partenaires d'interaction. A titre d'exemple des cellules n'exprimant pas les protéines Cas ou de la famille des tyrosines kinases Src présentent des défauts de remodelage des FAs. Ces observations suggèrent que FAK serait un acteur essentiel de la modulation de l'assemblage et du désassemblage des FAs localisées à l'avant et à l'arrière de la cellule (Sieg et al. 1999).

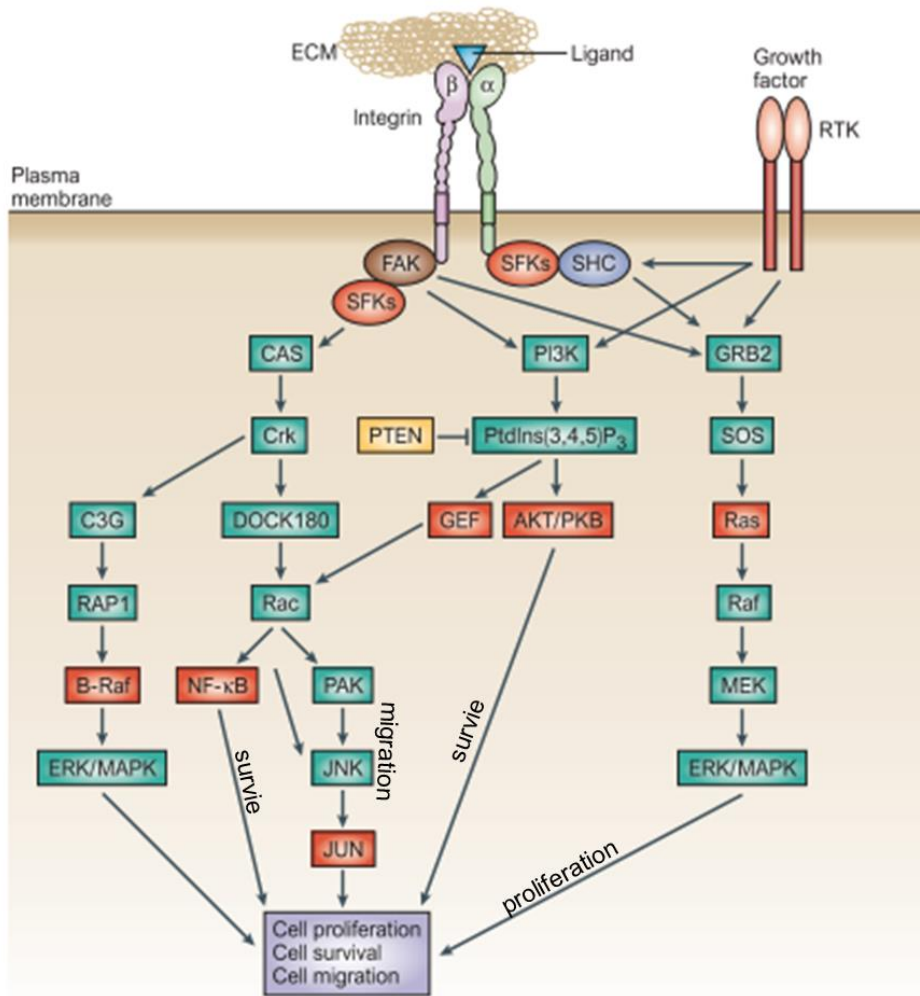


Figure III. 26: Voies de signalisation en aval des intégrines. L'hétérodimère intégrine $\alpha\beta$ se lie à la MEC ce qui, après fixation de la taline sur la queue cytoplasmique de la sous-unité β , permet le recrutement et l'activation de la kinase FAK par autophosphorylation sur la tyrosine 785. Une fois active FAK peut aussi bien activer directement les voies de signalisations PI3K/AKT et MAPK/ERK ou bien recruter et activer les kinases de la famille des tyrosine kinases SRC (SFK, Src kinase family) au niveau des plaques d'adhérence focale. Src phosphoryle p130CAS et la paxilline, ce qui lui permet de se lier au complexe Crk/DOCK180 et d'induire l'activation de Rac. Rac activé peut ensuite réguler différentes voie de signalisation avec en amont les protéines NF- κ B et PAK. FAK active la voie MAPK/ERK soit par le recrutement et l'activation de la GEF RAP1 soit par le recrutement du complexe GRB2/SOS. Indépendamment de FAK, certaines SFK telles que Fyn et Yes peuvent se lier à la partie cytoplasmique des sous-unités α de certaines intégrines ($\alpha5\beta1$, $\alpha1\beta1$ et $\alpha\beta3$). Ces SFK interagissant avec les intégrines, qui ont par avant subi une modification post-traductionnelle permettant leur stabilisation à la membrane plasmique (la palmitoylation), peuvent recruter et phosphoryler SHC, qui une fois associée à GRB2 et SOS peut activer la voie MAPK/ERK via RAS. L'activation de ces voies via SFKs et SRC/FAK conduit aux altérations du cytosquelette et de l'expression génique nécessaire pour induire la migration cellulaire et protéger les cellules de l'apoptose. Figure et légende d'après (Guo & Giancotti 2004)

4.2. L'adhésome, la maturation et le désassemblage des structures d'adhérence à la MEC

4.2.1. L'adhésome

Les intégrines, lorsqu'elles sont activées, constituent un point d'ancrage de plateformes de signalisation impliquées dans de nombreux processus cellulaires à l'état physiologique et pathologique tels que la migration, l'invasion, la survie ou la prolifération. Le clustering des intégrines nécessite un assemblage dynamique et finement régulé d'un ensemble protéique qui s'ancre à ses domaines cytoplasmiques – ce complexe constitue l'adhésome. Le site adhesome.org recense les composants de cette mégastucture et les interactions qui s'y passent. A ce jour, le réseau comprend 232 protéines (150 protéines bona fide et 82 associées) connectées par 6542 interactions (<http://adhesome.org/index.html>) (Winograd-Katz et al. 2014). Elles comprennent des protéines adaptatrices, des protéines du cytosquelette, des protéines liant l'actine, des tyrosine et serine/thréonine kinases, des tyrosine et serine/thréonine phosphatases, des GAPs, des GEFs, ainsi que des protéines transmembranaires et d'adhérence... ce qui reflète la complexité de la signalisation cellulaire impliquant les intégrines.

4.2.2. Maturation des structures d'adhérence

En fonction des types cellulaires et de l'environnement, les structures d'adhérence peuvent adopter différentes tailles, morphologies, et localisations. Elles diffèrent également par leur composition protéique. Néanmoins en absence de caractéristiques solides permettant leur classification, elles sont toutes appelées et catégorisées comme des « structures d'adhérence focale » définies en sous-classes incluant : les plaques d'adhérence naissantes, les complexes focaux, les plaques d'adhérence focales et les adhérences fibrillaires (Zaidel-Bar & Geiger 2010; Vicente-Manzanares et al. 2009; Geiger & Yamada 2011)(Figure III.27 et Figure III.28). Ces dernières sont rarement retrouvées dans les cellules qui migrent. Les plaques d'adhérence focale sont les structures d'adhérence focale les mieux caractérisées (Burrige & Guilluy 2015). Elles contiennent de nombreuses protéines cytoplasmiques et compte des protéines d'interaction aux intégrines, des protéines régulatrices et adaptatrices (Geiger & Yamada 2011) qui se lient au filament d'actine.

Les plaques d'adhérence naissantes sont des petites structures dynamiques dont la visualisation au microscope à épifluorescence par un marquage de la vinculine ou de la paxilline se manifeste sous la forme d'un point à la périphérie des lamellipodes et s'initierait par la formation d'un complexe comprenant au moins deux talines et deux hétérodimères d'intégrines qui sont connectées à un réseau d'actine branché induit par l'activation de la protéine Rac1 (Geiger et al. 2009). Durant le processus de migration, les plaques naissantes peuvent soit disparaître dans un intervalle de temps de 60 secondes soit évoluer, par exemple quand la cellule fait une pause, en une structure plus large (complexes focaux) qui deviendra une plaque d'adhérence focale mature. Cette dernière est large, allongée et liée aux extrémités des fibres de stress (Valdembri & Serini 2012). La formation du complexe focale se fait dans le lamellipode. Au cours de la maturation, la structure s'agrandit et glisse

progressivement vers la frontière entre le lamellipode et la lamelle (2-4 μm de l'extrémité du lamellipode), une zone à l'arrière du lamellipode (voir figure III.27 et 28). Les FA matures peuvent continuer d'évoluer dans la lamelle (Wolfenson et al. 2013). Le lamellipode et la lamelle sont caractérisés par un flux d'actine rétrograde (allant de la membrane au noyau) de vitesses respectives 0,5–7 $\mu\text{m}/\text{min}$ et 0,05–2,5 $\mu\text{m}/\text{min}$ (Alexandrova et al. 2008). Ces deux zones diffèrent également de part les moteurs moléculaires impliqués dans la polymérisation de l'actine et la densité du réseau d'actine. Comme vu précédemment, la contraction des filaments d'actine dans le lamellipode dépend essentiellement du complexe Arp2/3. Dans la lamelle, la densité d'actine corticale diminue et les complexes ARP2/3 disparaissent au profit de l'expression de la de de la myosine II, et plus particulièrement de l'isoforme myosine IIA, qui induit la formation de fibre de stress qui génèrent une force contractile (Ponti et al. 2004; Valotton et al. 2005; Geiger et al. 2009). Le flux d'actine rétrograde retrouvé dans le lamellipode et la lamelle exerce des forces sur les structures d'adhérences, les poussant vers le centre de la cellule, qui seraient responsables de la maturation des plaques. Ce prodédé serait dépendant la myosine II.

La myosine II et plus particulièrement la myosine IIA est un élément de la contraction cellulaire qui a été identifié comme régulateur majeur de la maturation des FA. En effet, l'inhibition de la contraction cellulaire par traitement des cellules avec la cytochalasine D (inhibiteur de la polymérisation de l'actine) induit à une disparition des complexes focaux (Alexandrova et al. 2008; Choi et al. 2008). A l'inverse, la maturation d'une plaque naissante à une FA mature est partiellement retrouvée dans des cellules dépourvues de myosine IIA, par un mutant myosine IIA qui se fixe à l'actine sans induire de contraction ou par une surexpression de α -actinine (Choi et al. 2008). La myosine II et α -actinine se fixent à différents domaines des filaments d'actine, et permettent, au stade précoce de la maturation, d'assembler les filaments entre eux afin de former un faisceau (fibre de stress). L'application d'une force extérieure sur les FA induit la maturation d'une plaque dans un modèle dépourvu de myosine IIA. En résumé, la maturation d'une FA semble répondre aux forces générées par la myosine II. Ceci est appuyé par le fait que les FA évoluent de la périphérie du lamellipode vers le centre de la cellule, soit dans le sens correspondant au flux d'actine retrouvé dans le lamellipode et la lamelle (Wolfenson et al. 2013; Geiger et al. 2009).

Une autre étude propose que la myosine II puisse contribuer à la maturation des FA par la modification de la composition des plaques d'adhérence. Les FAs de cellules HFF1 ont été isolées et leur protéome a été analysé à la suite de la contraction du cytosquelette ou d'une inhibition de la myosine II. Ceci révèle un enrichissement de protéines qui, dans le cas de la contraction, incluent des protéines contribuant à la maturation des FA et des protéines impliquées dans l'endocytose et le désassemblage des FA telle que la calpaine. Pour sa part, l'inhibition de la myosine II induit un enrichissement de protéines impliquées dans la formation des protrusions au travers de Rac1 (Kuo 2013).

La maturation des plaques nécessite le recrutement de composants moléculaires supplémentaires qui renforcent la taille des structures d'adhérence et la liaison cytosquelette/intégrine/MEC. L'initiation d'une plaque naissante par l'agrégation des intégrines et leur association avec la taline et la paxilline semble indépendante des forces générées par la myosine II (Alexandrova et al. 2008; Choi et al. 2008;

Vicente-Manzanares et al. 2007). En revanche, celles-ci sont indispensables au recrutement d'autres protéines des FA telle que la vinculine. La taline, outre le fait de connecter la partie intracytoplasmique des sous-unités β d'intégrines aux filaments d'actine, interagit également avec la vinculine. La fixation de la vinculine à la taline induit l'interaction de la queue de la vinculine aux filaments d'actine ce qui provoque une agrégation plus importante des intégrines en conformation active ce qui favorise l'ancrage à la MEC (Humphries et al. 2007) et au niveau intracellulaire, la vinculine renforce la liaison de l'intégrine à l'actine (Galbraith et al. 2002). En conclusion, tout comme le recrutement de protéines de l'adhésome, la myosine II est un élément clé du processus qui conduit la transition d'une plaque naissante à une plaque mature.

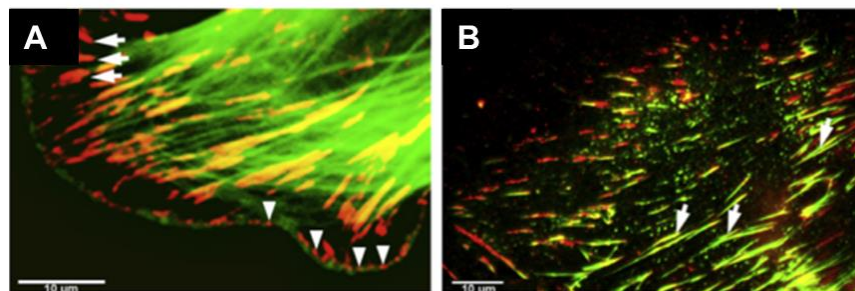


Figure III.27: Diversité des structures d'adhérence impliquant les intégrines. (A) Plaques d'adhérence focale (flèche) et complexe d'adhérence (tête de flèche) formées dans des fibroblastes humains et marquées sur la paxilline (rouge) et l'actine (vert). (B) Adhérence fibrillaire. Marquage de la tensine en rouge et de la fibronectine en vert. Barre d'échelle: 10µm Figure et légende adaptée de Wolfenson

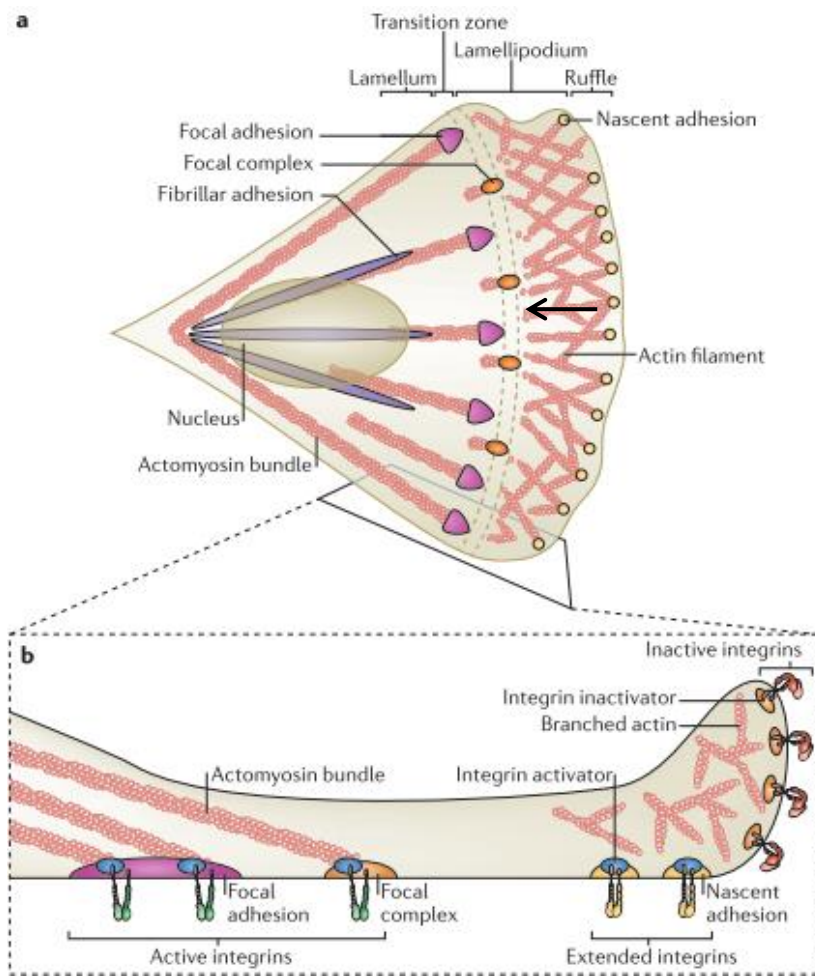


Figure III.28: Maturation des structures d'adhérence focale impliquant les intégrines. (a) Au front de migration des cellules en mouvement, au niveau des lamellipodes constitués d'un réseau d'actine corticale, se forme des structures d'adhérence naissantes constituées d'un ou deux dimères d'intégrines, de la kinase FAK et de la paxilline. Les plaques d'adhérence naissantes sont des structures transitoires qui peuvent soit se désassembler soit évoluer en un complexe focal qui est localisé entre le lamellipode et la lamella. La maturation de ces structures par l'ajout de composants adaptateurs et régulateurs tels que la vinculine et l' α -actine forment une plaque d'adhérence focale connectée au cytosquelette d'actine. Ces structures sont généralement localisées au niveau de la lamella. La contraction de l'actomyosine contribue à la maturation et au renforcement des plaques d'adhérence focales aux fibres d'actine. → La flèche noire représente le sens du flux d'actine générée par la contraction cellulaire. A ce stade d'autres composants de l'adhésome tel que la zyxine, sont également recrutés. Enfin les plaques d'adhérence focales peuvent former des adhésions fibrillaires dans lesquelles la taline est remplacée par la tensine. Ces structures sont rarement observées dans les cellules qui migrent. Le processus de maturation des plaques est un système dynamique où chaque type de structure peut être désassemblée et renouvelée afin de permettre la migration des cellules. (b) Le plan B montre la localisation des intégrines selon leur état d'activation. Les intégrines en conformation inactive sont généralement localisées à la membrane plasmique où elles sont maintenues à l'état inactif au travers de la fixation de leurs régulateurs négatifs sur la queue cytoplasmique des sous-unités β . Comme inactivateurs des intégrines on compte les protéines ICAP, Filamine ou encore SHARPIN. Les intégrines en conformation ouverte mais inactive sont localisées au niveau des plaques d'adhérence naissantes tandis que les intégrines actives sont généralement associées à plaques d'adhérence focale. Figure et légende adaptées de (Bouvard et al. 2013)

4.2.3. Désassemblage des structures d'adhérence

Une fois la plaque d'adhérence formée et maturée, la signalisation intracellulaire des intégrines déclenchée par l'activation de FAK/Src, les intégrines se détachent de leur ligand et les protéines des plaques d'adhérence sont clivées ou endocytées. La structure d'adhérence se désassemble. Cette étape facilite la migration des cellules. En fonction des conditions, les structures d'adhérence peuvent se désassembler soit entièrement soit partiellement. Les mécanismes moléculaires impliqués dans le désassemblage des FA sont encore peu connus. Les données répertoriées dans la littérature discutent de la compétition entre les activateurs et les inhibiteurs des intégrines, leur état de phosphorylation et la protéolyse des composants de l'adhésome. En revanche il est bien établi que l'inhibition de la myosine IIA affecte la contraction cellulaire et favorise le désassemblage des FA (Geiger et al. 2009; Wolfenson et al. 2013).

Le désassemblage des FA implique également la protéolyse des composants des FA par la calpaïne, comme tel est le cas avec la protéolyse de la taline, de FAK (Kuo et al. 2011; Kuo 2013) mais également de la queue cytoplasmique des sous-unités β qui favoriserait la rétraction de l'uropode plutôt que l'étalement de la cellule (Yingjie Xu et al. 2010). La calpaïne est une enzyme qui sert de régulateur négatif des plaques d'adhérence par le clivage de la taline et de FAK qui induit le désassemblage de ces structures impliquant les intégrines (Franco et al. 2004; Chan et al. 2010).

Lorsqu'une cellule migre, les FA matures et immobiles, se retrouvent sous l'effet de la rétraction de l'uropode à l'arrière de la lamella et ces structures se désassemblent. Les microtubules, qui sont riches dans cette région pourraient être impliqués dans le désassemblage des FA matures puisqu'il a été montré dans des cellules dont le réseau de microtubules est perturbé (inhibition de la kinesine) que les FA et les fibres de stress sont larges et stables.

En plus de la dynamique du cytosquelette d'actine, certains composants membranaires localisés au niveau des FAs pourraient réguler la formation, la stabilité mais aussi le désassemblage de ces structures. C'est notamment le cas des PIPs qui régulent le recrutement et l'affinité des protéines portant un domaine PTB (taline, la vinculine, la kindline, FAK et ILK (integrin-linked kinase) pour leur fixation sur les motifs NPxY/NxxY. La taline, la vinculine et FAK sont activées et régulées par le PIP2 alors que la kindline et ILK sont sensibles au PIP3. Ainsi des variations locales des quantités de ces phospholipides peuvent contribuer au désassemblage des FAs (Wehrle-Haller 2012). C'est notamment ce qui est observé avec l'augmentation du taux de PIP2 qui favorise l'endocytose des intégrines (Chao & Kunz 2009; Ezratty et al. 2009) et le recrutement des protéines adaptatrices NUMB et DAB2 (Disassembled homolog 2) qui se lient aux motifs NPxY et NxxY des intégrines puis induisent leur internalisation (Chao & Kunz 2009; Ezratty et al. 2009). L'internalisation des intégrines se fait par des voies dépendantes ou indépendantes des clathrines. NUMB et Dab2 sont impliquées dans le mécanisme d'endocytose clathrine-dépendant. Clathrine et Dab2 sont recrutées aux FAs localisées au niveau de la lamelle des cellules qui migrent, et régulent l'internalisation de l'intégrine $\alpha 5 \beta 1$ pour favoriser la migration. De même, suite à sa phosphorylation NUMB favorise la migration des cellules par l'internalisation des intégrines $\beta 1$ et $\beta 3$ localisées dans les FAs au front de migration de

la cellule (Nishimura & Kaibuchi 2007). Les intégrines endocytées peuvent ensuite être dirigées vers les endosomes précoces (boucle de recyclage courte) ou vers le compartiment de recyclage périnucléaire (boucle de recyclage longue) (Margadant et al. 2011). Les vésicules contenant les intégrines recyclées sont alors redirigées vers les plaques à l'avant de la cellule ou dans d'autres structures, plus internes à l'arrière de la cellule où les intégrines seront réutilisées pour contribuer à la formation ou à la maturation de plaques d'adhérence.

Une autre hypothèse de renouvellement implique directement le recrutement de la taline et de la kindline au niveau des motifs NPxY/NxxY. Après son recrutement au niveau du complexe formé de la taline/kindline/intégrines, FAK interagit et coopère avec Src ce qui induit l'activation des acteurs des voies de signalisation en aval des intégrines puis le renouvellement des FAs. Ainsi il est possible que le cycle de désassemblage/désassemblage des FAs découle de l'inactivation des intégrines à la suite de la phosphorylation des motifs NPxY/NxxY par la kinase Src, ce qui empêcherait le maintien de l'interaction avec la taline et la kindline au profit de la fixation des inhibiteurs des intégrines tels que la filamine ou Dok1 (Wang et al. 2011; Anthis et al. 2009; Bledzka et al. 2010).

5. Les intégrines et cancers

Lors de la progression tumorale de nombreuses modifications cellulaires et extracellulaires s'opèrent de façon à favoriser, par exemple, les différentes étapes de la dissémination métastatique. Les intégrines font parties des molécules dont l'expression varie considérablement durant ce processus. Ces modulations d'expressions peuvent en partie contribuer à la migration des cellules de mélanome uvéal en leur permettant de s'adapter à la variabilité des matrices tissulaires, notamment durant les processus d'extravasation ou d'intravasation. Ainsi des intégrines qui peuvent être peu exprimées dans des tissus épithéliaux sains, se retrouvent surexprimées dans certaines tumeurs.

Nombreuses sont les intégrines qui participent à la progression tumorale et dont la surexpression a été décrites dans les cancers métastatiques. En revanche le panel des intégrines exprimées à la surface des cellules diffère d'un type de cancer à l'autre.

De nombreuses études rapportent une surexpression des intégrines dans les cancers humains tels que le mélanome cutané, le cancer de la prostate, du colon et du cancer du sein, avec une corrélation de la progression métastatique. Cela concerne plus particulièrement les hétérodimères d'intégrines $\alpha 5\beta 1$, $\alpha 4\beta 1$, $\alpha V\beta 3$ ou $\alpha V\beta 5$ (Desgrosellier & Cheresh 2010). Par ailleurs, en raison de l'importance de l'expression des intégrines dans la progression du cancer des poumons, l'expression des intégrines $\alpha 5$, $\beta 1$, $\beta 3$ a été proposé d'une part comme marqueur pronostic de la survie des patients présentant un stade précoce de ce cancer et d'autre part comme marqueur de la colonisation métastatique des ganglions lymphatiques (Shibue & Weinberg 2009). Cependant ces variations d'expressions restent complexes et dépendent du tissu d'origine de la tumeur et de son stade de progression (guo et giancotti 2004).

5.1. Expression des intégrines dans le mélanome uvéal

Dans des mélanocytes uvéaux mis en culture, les hétérodimères à isoforme $\beta 1$ sont majoritairement retrouvés. Des études immunohistochimiques ont en effet permis d'identifier l'expression des intégrines $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 3\beta 1$, $\alpha 5\beta 1$, et $\alpha v\beta 3$. En revanche, les intégrines $\alpha 1\beta 1$, $\alpha 4\beta 1$ et $\alpha 6\beta 1$ ne sont pas exprimées (Elshaw et al. 2001).

L'expression des intégrines a également été analysées à la surface des vaisseaux sanguins. Y sont présentes les sous-unités $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 5$, $\alpha 6$, αv , $\beta 1$, $\beta 2$ et $\beta 3$ (Elner & Elner 1996).

Plusieurs études immunohistochimiques également réalisées sur les tumeurs primaires de mélanomes uvéaux ont permis d'identifier l'expression des intégrines à la surface des cellules tumorales. Une première étude rapporte l'expression des hétérodimères $\alpha 1\beta 1$, $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 3\beta 1$, $\alpha 5\beta 1$, et $\alpha v\beta 3$ dans l'ensemble des tumeurs analysées. Ces hétérodimères ont pour substrat préférentiel les collagènes ($\alpha 1\beta 1$, $\alpha 2\beta 1$), les laminines ($\alpha 3\beta 1$), et la fibronectine ($\alpha v\beta 3$, $\alpha 5\beta 1$). L'intégrine $\alpha 4\beta 1$ est exprimé dans 70% des tumeurs analysées alors que 60% expriment $\alpha 6\beta 1$ (Elshaw et al. 2001). Les sous-unités $\alpha 3$, $\alpha 5$, αv , $\beta 1$ ont également été détectées dans l'ensemble des échantillons provenant d'une cohorte des 32 tumeurs primaires de mélanome uvéal. 100% expriment également l'hétérodimère $\alpha v\beta 5$ tandis qu'une faible proportion exprime $\alpha 4$, $\alpha 1$, $\alpha 2$ et aucune lésion n'exprime $\beta 4$ ou encore l'hétérodimère majoritairement retrouvé dans le mélanome cutané, $\alpha v\beta 3$ (Paul J. M. ten Berge et al. 1993). Aucune corrélation n'est cependant révélée entre l'expression des intégrines et le degré d'invasivité des tumeurs. En revanche, deux études plus récentes semblent montrer que l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ régulerait négativement la tumorigénèse du mélanome uvéal. En effet, l'expression de la sous-unité $\alpha 5$ est inversement associée aux propriétés hautement prolifératives et invasives de lignées de cellules de mélanome uvéal. Et faire exprimer la sous-unité $\alpha 5$ dans des cellules de mélanome uvéal réduit leur propriété proliférative *in vitro* et *in vivo* (Béliveau et al. 2000; Béliveau et al. 2001; Landreville et al. 2011)

En résumé, nous constatons que certaines variations d'expression existent entre les cohortes de MU étudiées, cependant le point évident qui en ressort est l'expression de l'intégrine $\beta 1$ dans tous les échantillons analysés ce qui en fait la sous-unité β majoritairement exprimée dans les tumeurs de mélanome uvéal.

Dans l'étude de Elshaw, $\alpha 1\beta 1$ et $\alpha 6\beta 1$ sont respectivement exprimées dans 100% et 70% des lésions de MU analysées alors qu'elle ne le sont pas dans les mélanocytes normaux analysé (Elshaw et al. 2001). Cette observation pourrait suggérer l'implication de ces dimères d'intégrines dans la transformation néoplasique des mélanocytes et/ou dans la progression métastatique des cellules de mélanome uvéal. L'intégrine $\beta 1$ associée aux sous-unités $\alpha 3$ ou $\alpha 6$ reconnaît la laminine; et lorsqu'il est hétérodimérisé avec la sous-unité $\alpha 1$, il se lie différents types de collagène incluant le type IV (Tulla et al. 2001). Comme cité précédemment la laminine et le collagène IV sont deux constituants de la lame basale. Ainsi, il est possible que les mélanocytes uvéaux tumoraux qui ont acquis des propriétés invasives nécessitent l'expression des hétérodimères $\alpha 6\beta 1$ et $\alpha 1\beta 1$ à leur surface pour permettre une adhérence

optimale aux fibres de laminine et de collagène IV retrouvées dans la lame basale choriocapillaire lors de l'envahissement de la membrane de Bruch.

Par ailleurs des études d'immunomarquage de trois tumeurs primaires de mélanome uvéal montrent la présence de collagène IV, fibronectine et laminine autour des vaisseaux sanguins alimentant la tumeur. Ceci suggère qu'in vivo ces composants de la lame basale sont présents dans le microenvironnement des tumeurs de mélanome uvéal. Par des expériences in vitro réalisées sur une lignée cellulaire de mélanome uvéal SP6.5, ces mêmes auteurs montrent que l'adhérence des cellules sur ces différents composants est dépendante de l'intégrine $\beta 1$ (Bérubé et al. 2005).

5.2. Les intégrines dans la migration cellulaire

Pour disséminer dans un organe à distance de la tumeur primaire, les cellules cancéreuses doivent traverser plusieurs lames basales et migrer au travers de matrices interstitielles variées. Cette étape nécessite notamment la contribution des intégrines pour réguler d'une part la signalisation et d'autre part la dynamique du cytosquelette et des plaques d'adhérence focales qui jouent un rôle fondamental dans la migration cellulaire. Les intégrines contrôlent les signaux en lien avec la migration cellulaire par la régulation de plusieurs voies de signalisation impliquant les protéines effectrices Rho, Rac, CDC42 et Src (Figure III.29). L'activation de ces acteurs du remodelage du cytosquelette et des FA est sous le contrôle de la kinase FAK et aboutit notamment à la l'extension des lamellipodes (Rac) et du désassemblage des structures d'adhérence (Src). L'importance de FAK dans la migration cellulaire a été démontrée suite à un défaut de migration de fibroblastes déficients en FAK. En accord avec la présence de larges plaques d'adhérence, ces cellules FAK^{-/-} migrent moins vite que les fibroblastes exprimant FAK (Ilić et al. 1995). Les niveaux d'expression élevés de FAK dans les cancers humains pourraient expliquer, en partie, la vitesse de migration anormalement élevée des cellules cancéreuses. De même, dans une grande majorité de cancer l'expression des intégrines $\beta 3$ et $\beta 1$ est un élément clé de l'adhérence et de la migration cellulaire cancéreuses. Plusieurs études montrent le rôle des intégrines $\alpha 2\beta 1$ and $\alpha 3 \beta 1$ dans la migration des cellules de mélanome cutané sur une matrice de collagène IV ou de laminine (Pekka & Jyrki 2013). Dans le site de la tumeur primaire tout comme dans les métastases, les cellules cancéreuses ont la capacité de s'adapter au microenvironnement en modifiant le répertoire des intégrines exprimées à leur surface. Ainsi l'interaction des ligands de la MEC aux intégrines contribue également à favoriser la migration des cellules. Une étude montre que l'interaction de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ à la surface de cellules du cancer du col de l'utérus (SiHa) induit à la fois l'expression de MMP9 quand les cellules sont étalées sur une matrice de laminine, ou l'activation de la pro-MMP9 et pro-MMP2 sur une matrice de fibronectine. La coopération entre ces deux acteurs de la migration a pour conséquence l'activation des voies de signalisations PI3K et ERK en aval de la kinase FAK (Maity et al. 2010; Maity et al. 2011).

5.3. Les intégrines dans l'invasion et la formation des métastases

L'intégrine $\alpha\beta_3$, qui se lie aux protéines de MEC portant un domaine RGD telles que la vitronectine ou à la fibronectine, est surexprimée dans les glioblastomes et les mélanomes cutanés. Dans des cellules de mélanome cutané, L'expression de $\alpha\beta_3$ dans des cellules de mélanome cutané induit l'invasion du derme dans un modèle artificiel de peau humaine reconstruite en 3D (Hsu et al. 1998). En association avec les RTK incluant le récepteur au facteur de croissance épidermique (EGF, Epidermal growth factor) ou le récepteur au facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF, Vascular endothelial growth factor) l'intégrine $\alpha\beta_3$ favorise la migration cellulaire (Giancotti & Tarone 2003). Cependant le rôle de $\alpha\beta_3$ dans l'invasion semble corrélér au recrutement et à l'activation de MMP2 (Brooks 1998). L'implication des intégrines dans l'angiogenèse, la migration et les métastases, notamment hépatiques, a été soulignée par l'utilisation d'un antagoniste de l'intégrine $\alpha\beta_3$ dans des cellules de lymphomes qui induit l'apoptose des cellules vasculaires et empêche l'invasion des cellules cancéreuses. (Brooks 1994). Bien que la plupart des intégrines semble promouvoir la tumorigénèse, que ce soit par la survie, la prolifération ou la migration des cellules cancéreuses, d'autres intégrines, dont l'intégrine $\alpha_4\beta_1$, peuvent intervenir de manière contradictoire dans la progression de la pathologie. Si celle-ci peut inhiber l'invasion de cellules de mélanome cutané B16F1 dans un modèle d'invasion en matrigel *in vitro* et la formation de métastases, elle n'altère pas l'évolution de la croissance tumorale (quian F 1994).

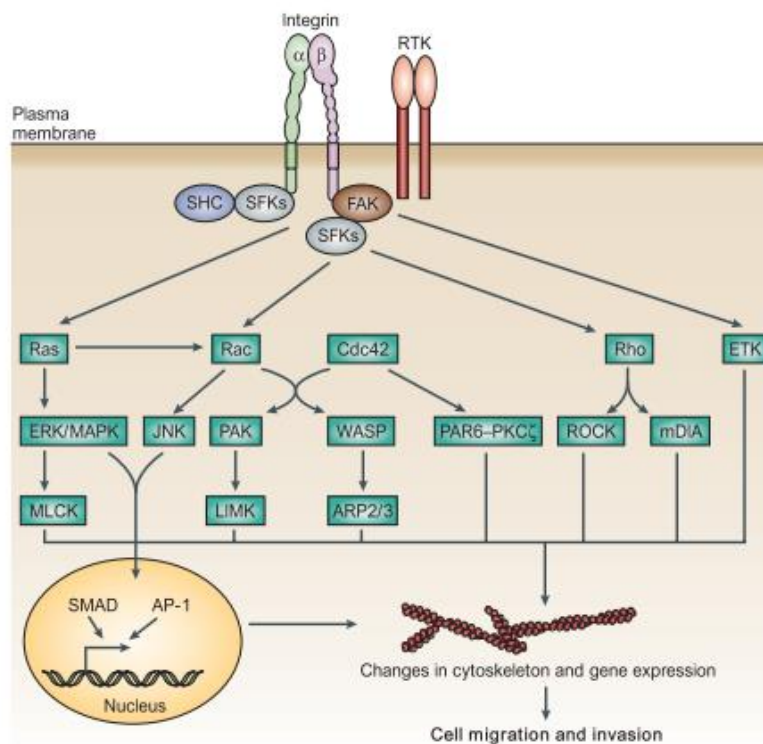


Figure III. 29: Rôle de des kinases FAK et de la famille SFK dans la migration et l'invasion induite par les intégrines. La régulation des signaux pro-migratoires induits par les intégrines est complexe et inclue les kinases

FAK et Src. Les signaux contrôlés par ces kinases orchestrent les changements opérés sur le cytosquelette et l'induction des gènes nécessaires à la migration. Rac et CDC42 sont respectivement impliqués dans la formation des lamellipodes et des filopodes. Tous deux activent les protéines de la famille WASP et PAK, qui activent ensuite ARP2/3 et LIMK, respectivement, pour induire la polymérisation du cytosquelette d'actine. La transduction des signaux en amont de MLCK, de Rho et ROCK et de mDia permettent leur activation et la régulation de la formation et de la contraction des fibres d'actomyosine (fibre de stress). Ce phénomène contribue au renouvellement des plaques d'adhérence focales. PAR6 et PKC fonctionnent en aval de CDC42 pour contrôler la polarité de la cellule. L'activation des voies MAPK/ERK et MAPK/JNK favorise la migration par induction de la transcription des gènes dépendants du facteur de transcription. L'activation de la signalisation TGF β /SMAD en aval de MAPK/ERK induit la transitio-épithéliomésenchymateuse. SFK : Src family kinase Figure et légende adaptée de (Desgrosellier & Cheresch 2010)

PARTIE IV : OBJECTIFS DES TRAVAUX DE RECHERCHE

Comme nous l'avons vu dans la sous partie I 2.4.3 « Surexpressions de gènes corrélés avec la progression du mélanome uvéal » page 53, le gène codant PRL-3 est surexprimé dans les tumeurs de mélanome uvéal qui ont métastasé et cette surexpression est prédictive du mauvais pronostic de survie des patients (Laurent et al. 2011). Afin d'approfondir cette observation, notre laboratoire a décidé d'investiguer le rôle de PRL-3 dans le processus métastatique du mélanome uvéal, tel qu'il avait déjà été relaté dans de nombreux autres types de cancers (voir section II.2.1.1 page 71).

A cet effet, peu de temps avant mon arrivée dans l'équipe, le laboratoire a établi trois lignées cellulaires de mélanome uvéal OCM-1 exprimant stablement une fusion GFP de PRL-3 (OCM1-PRL3), de son mutant catalytiquement inactif C104S (OCM1-C104S) ou la GFP seule (OCM1-GFP). Le mutant dépourvu d'activité catalytique a été obtenu en substituant la cystéine 104 du motif CX5R par une sérine (C104S). Il a été montré que la surexpression de PRL-3 dans des cellules de mélanome uvéal OCM-1 augmentait les propriétés pro-migratoires *in vitro* et pro-invasives *in vivo* dans un modèle d'invasion de la membrane chorioallantoïde de l'embryon de poulet (Laurent, et al. 2011) (Figure IV.30). Cet effet, dépendant de l'activité phosphatasique de la protéine, suggère **un rôle direct de PRL-3 dans le processus métastatique du mélanome uvéal.**

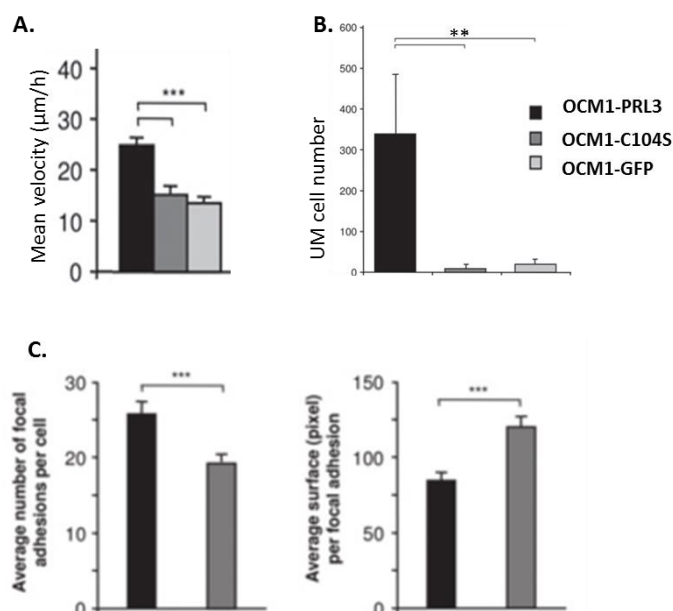


Figure IV. 30: Implication de PRL-3 dans la migration et l'invasion des cellules de mélanome uvéal. (A) Mesure de la vitesse de migration des cellules OCM1-PRL3, OCM1-C104S et OCM1-GFP sur collagène I. L'histogramme indique la valeur moyenne de deux expériences indépendantes, réalisées en duplicats. Nombre de cellules suivies PRL-3 = 51; C104S = 39; GFP = 46. ***: $p < 1,2 \times 10^{-5}$. (B) Analyse quantitative de l'invasion des cellules OCM1 dans le fémur de l'embryon de poulet. Nombres d'embryons analysés: PRL-3 = 5; C104S = 8; GFP = 3. Ce résultat a été reproduit dans deux autres expériences indépendantes. (C) Quantification du nombre (gauche) et de l'aire (droite) des plaques d'adhérence focales marquées par p-Y397 FAK. Les histogrammes représentent les valeurs moyennes de sept expériences indépendantes.

L'objectif général du laboratoire et de ma thèse s'est axé dans la suite logique de ces observations, puisque nous travaillons à élucider les mécanismes d'action de PRL-3 en recherchant des cibles qui pourraient être impliquées dans ses processus pro-migratoires et pro-invasifs.

Laurent et al ont également démontré par un immunomarquage de la protéine FAK auto-activée que les cellules exprimant PRL-3 présentaient plus de plaques d'adhérence focales (FA), mais de surface plus petites que celles formées dans les cellules exprimant le mutant de PRL-3. Suite à cette observation nous avons émis l'hypothèse que PRL-3 pourrait contribuer à la régulation de protéines impliquées dans le remodelage des FA lors du processus de migration. Dans ce sens, et en raison de l'importance de l'ancrage membranaire de PRL-3 pour l'induction de ses effets pro-migratoires dans un modèle de mélanome cutané (section II.1.1.3) (Song et al. 2009c) nous nous sommes intéressés à ses substrats potentiels, localisés à la membrane plasmique, dont les fonctions seraient associées aux mécanismes moléculaires d'adhérence, de migration cellulaire et d'invasion telles que les intégrines et les métalloprotéases trans-membranaires MT-MMPs.

- La majeure partie des mes recherches ont été concentrées sur l'intégrine β_1 qui est la sous-unité β avec le plus haut taux d'expression transcriptomique dans notre cohorte de tumeur de mélanome uvéal. De manière similaire, l'intégrine β_1 est détectée à des niveaux protéiques importants dans les tumeurs primaires et les métastases de différentes cohortes de mélanome uvéal et décrite comme interagant de PRL-3 dans des lignées de cancers colorectaux. En revanche l'intégrine $\alpha V\beta_3$ est faiblement exprimée, faisant ainsi de l'intégrine β_1 l'isoforme majoritairement dérégulée dans le mélanome uvéal (Baker et al. 2001; Marshall et al. 1998; Ten Berge et al. 1993). Dans notre cohorte, l'expression transcriptomique de l'intégrine β_1 est invariable entre les tumeurs de faible et haut risque métastatique. Cependant comme elle a été décrite comme interagant de PRL-3, tout comme l'intégrine α_1 , et qu'elle possède des sites de phosphorylation (voir partie III) nous proposons une approche régulatrice par déphosphorylation. Ce récepteur transmembranaire, précurseur de la formation des structures d'adhérence, possède un motif intracytoplasmique S/T dont l'état de phosphorylation affecte la dynamique de remodelage des plaques d'adhérence focales. Nous avons donc réalisé des expériences *in vitro* afin de démontrer que la déphosphorylation du motif S/T de l'intégrine β_1 pourrait contribuer à la migration cellulaire au travers du remodelage des FA.
- Dans un second temps, j'ai consacré une petite partie de ma thèse à étudier l'implication de PRL-3 dans l'invasion des cellules humaines de mélanome uvéal OCM-1. Comme mentionné dans la section III 3.1.3 page 93) la protéolyse des protéines de la MEC au front de migration est un évènement, qui comme l'adhérence, est essentiel à la migration et à l'invasion cellulaire et qui fait intervenir des MMPs. Les MMPs sont par conséquent des régulateurs positifs de la progression tumorale métastatique. Le rôle de MT1-MMP, encore appelée MMP14, est décrit dans la progression métastatique de divers types de cancers tels que le mélanome cutané ou le cancer de l'ovaire. MMP14

est ancrée à la membrane plasmique et peut dégrader une large variété de composants de la matrice tels que le collagène I, la fibronectine et la vitronectine afin de permettre l'invasion de la lame basale et des différents tissus. Son activité protéolytique à la surface des cellules est négativement régulée par endocytose, ainsi il est envisageable que le caractère invasif des cellules de mélanome uvéal soit amélioré en conséquence d'un trafic vésiculaire accru. Comme pour l'intégrine $\beta 1$, l'expression transcriptomique de MMP14 n'est pas différentielle entre les tumeurs de faible et haut risque métastatique, nous émettons donc l'hypothèse que l'expression de PRL-3 pourrait contribuer à la migration et à l'invasion par une régulation de l'activité protéolytique de MMP14 à la surface des cellules de mélanome uvéal.

Les expériences qui seront présentées dans ces études ont été réalisées avec des cellules de mélanome uvéal OCM1-PRL3, OCM1-C104S et OCM1-GFP. Le terme « cellules contrôles » qui sera employé par la suite fait référence aux cellules OCM1-C104S et OCM1-GFP. Pour certaines expériences réalisées dans le cadre de l'étude de PRL-3/MMP14 nous avons utilisé des cellules issues de modèles de tumeurs PDX (patient-derived xenografts) MP41 et MP55. Les cellules sont ensemencées sur une matrice de collagène de type I qui est à la fois substrat de l'intégrine $\beta 1$ lorsqu'il est couplé à la sous-unité $\alpha 1$ et substrat de MMP14. Enfin des approches de sous-expression par interférence ARN de l'intégrine $\beta 1$ et de MMP14 ont été réalisées.

- A côté de la compréhension du rôle fondamental de PRL-3 dans le processus métastatique, nous avons commencé à nous intéresser aux moyens que l'on pourrait mettre en œuvre pour inhiber l'action de PRL-3 afin de proposer des solutions thérapeutiques aux patients dont les tumeurs présentent des taux élevés du gène codant cette protéine. Puisque la pentamidine est une molécule déjà mise sur le marché dont l'action inhibitrice contre les membres de la famille des PRLs a été montrée (Pathak et al. 2002b), nous proposons d'étudier son effet sur la croissance des xénogreffes issues de tumeurs de patients de mélanome uvéal exprimant PRL-3. Les expériences ont été réalisées par le laboratoire d'investigation préclinique et des expériences préliminaires *in vitro* ont été réalisées au laboratoire.

RESULTATS

PRESENTATION DES RESULTATS

Les résultats de mes travaux de recherche seront présentés en deux parties.

> La première partie (PARTIE A) sera consacrée à la compréhension du rôle de la phosphatase PRL-3 dans l'adhérence, la migration et l'invasion des cellules de mélanome uvéal, d'une part par la régulation de l'état de phosphorylation du motif S/T de l'intégrine $\beta 1$, (Article 1) et d'autre part par son action sur l'accumulation de MMP14 à la surface des cellules de mélanome uvéal (Article 2). Les résultats obtenus ont fait l'objet de deux articles. L'article 1 a été publié en 2017 dans le journal «Experimental Cell Research », et pour lequel je suis premier auteur. L'article 2, auquel j'ai contribué, a fait l'objet d'une publication dans le journal « Investigative Ophthalmology & Visual Science (IOVS) » en 2016.

Article 1 (publié):

PRL-3/PTP4A3 phosphatase regulates integrin $\beta 1$ in adhesion structures during migration of human ocular melanoma cells.

Malika Foy, Océane Anezo, Simon Saule, Nathalie Planque

Article 2 (publié):

Protein Tyrosine Phosphatase 4A3 (PTP4A3) Promotes Human Uveal Melanoma Aggressiveness Through Membrane Accumulation of Matrix Metalloproteinase 14 (MMP14)

Selma Maacha, Océane Anezo, Malika Foy, Géraldine Liot, Laurence Méry, Cécile Laurent, Xavier Sastre-Garau, Sophie Piperno-Neumann, Nathalie Cassoux, Nathalie Planque, and Simon Saule

*PTP4A3 : autre nom de PRL-3

>La seconde partie (PARTIE B) présentera les résultats obtenus concernant l'évaluation des effets de la pentamidine sur la croissance de xénogreffes dérivées d'une tumeur de patients (PDX, patient-derived xenografts) de mélanome uvéal exprimant la phosphatase PRL-3 et sur son activité *in vitro*. Ces résultats nécessitent plus d'investigation et par conséquent ne seront pas présentés sous forme d'article scientifique.

Version de diffusion modifiée. Voir exemplaire de la bibliothèque pour accéder à la version complète.

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

- Abdel-Rahman, M.H. et al., 2006. High frequency of submicroscopic hemizygous deletion is a major mechanism of loss of expression of PTEN in uveal melanoma. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 24(2), pp.288–95.
- Adams, J.C., 2001. Cell-matrix contact structures. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 58(3), pp.371–392.
- Ahn, J.H. et al., 2006. *Synthesis and biological evaluation of rhodanine derivatives as PRL-3 inhibitors*, Available at:
- Al-Aidaros, A.Q.O. & Zeng, Q., 2010. PRL-3 phosphatase and cancer metastasis. *Journal of Cellular Biochemistry*, 111(5), pp.1087–1098. Available at:
- Alexandrova, A.Y. et al., 2008. Comparative dynamics of retrograde actin flow and focal adhesions: formation of nascent adhesions triggers transition from fast to slow flow. C.-P. Heisenberg, ed. *PloS one*, 3(9), p.e3234.
- All-Ericsson, C. et al., 2002. Insulin-like growth factor-1 receptor in uveal melanoma: a predictor for metastatic disease and a potential therapeutic target. *Investigative ophthalmology & visual science*, 43(1), pp.1–8.
- Alonso, A. et al., 2004. Protein Tyrosine Phosphatases in the Human Genome. *Cell*, 117(6), pp.699–711.
- Amaro, A. et al., 2017. The biology of uveal melanoma. *Cancer and Metastasis Reviews*.
- Amirouchene-Angelozzi, N. et al., 2016. The mTOR inhibitor Everolimus synergizes with the PI3K inhibitor GDC0941 to enhance anti-tumor efficacy in uveal melanoma. *Oncotarget*, 7(17), pp.23633–23646.
- Andres, D.A. et al., 1993. cDNA cloning of component A of Rab geranylgeranyl transferase and demonstration of its role as a Rab escort protein. *Cell*, 73(6), pp.1091–9.
- Anthis, N.J. et al., 2009. β Integrin Tyrosine Phosphorylation Is a Conserved Mechanism for Regulating Talin-induced Integrin Activation. *Journal of Biological Chemistry*, 284(52), pp.36700–36710.
- Ardjomand, N et al., 2005, Lymph node metastases arising from uveal melanoma. *Wien Klin Wochenschr*, 117(11-12), pp 433-35.
- Babchia, N. et al., 2010. The PI3K/Akt and mTOR/P70S6K Signaling Pathways in Human Uveal Melanoma Cells: Interaction with B-Raf/ERK. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 51(1), p.421.
- Baker, J.K. et al., 2001. Expression of integrins, degradative enzymes and their inhibitors in uveal melanoma: differences between in vitro and in vivo expression. *Melanoma research*, 11(3), pp.265–73.
- Ballestrem, C. et al., 2001. Marching at the front and dragging behind: differential α V β 3-integrin turnover regulates focal adhesion behavior. *The Journal of cell biology*, 155(7), pp.1319–32.
- Bardelli, A. et al., 2003. PRL-3 expression in metastatic cancers. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 9(15), pp.5607–15.
- Barnhill, R.L., Ye, M., Batistella, A., Stern, M.-H., et al., 2017. The biological and prognostic significance of angiotropism in uveal melanoma. *Laboratory Investigation*.
- Barnhill, R.L., Ye, M., Batistella, A., Stern, M., et al., 2017. The biological and prognostic significance of angiotropism in uveal melanoma. , 97(December 2016), pp.746–759.
- Barsky, S.H. et al., 1983. Loss of basement membrane components by invasive tumors but not by their benign counterparts. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, 49(2), pp.140–7.
- Basak, S. et al., 2008. The Metastasis-Associated Gene Prl-3 Is a p53 Target Involved in Cell-Cycle Regulation. *Molecular Cell*, 30(3), pp.303–314.
- Bass, M.D. et al., 2008. p190RhoGAP is the convergence point of adhesion signals from α 5 β 1

- integrin and syndecan-4. *The Journal of cell biology*, 181(6), pp.1013–26.
- Battiste, J.L. et al., 2000. The eIF1A solution structure reveals a large RNA-binding surface important for scanning function. *Molecular cell*, 5(1), pp.109–19.
- Béliveau, A. et al., 2000. Expression of integrin $\alpha 5\beta 1$ and MMPs associated with epithelioid morphology and malignancy of uveal melanoma. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 41(8), pp.2363–2372.
- Béliveau, A. et al., 2001. *Tumorigenicity of the Mixed Spindle-Epithelioid SP6.5 and Epithelioid TP17 Uveal Melanoma Cell Lines Is Differentially Related to $\alpha 5\beta 1$ Integrin Expression*, C.V. Mosby Co.
- Benjamin A Krantz, Nikita Dave, Kimberly M Komatsubara, B.P.M. & Carvajal, R.D., 2017. Uveal melanoma: epidemiology, etiology, and treatment of primary disease. *clinical ophthalmology*, 11, pp.279–289.
- Ten Berge, P.J.M. et al., 1993. Integrin expression in uveal melanoma differs from cutaneous melanoma. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 34(13), pp.3635–3640.
- Bérubé, Mélanie et al. 2005. “Role of the Extracellular Matrix Proteins in the Resistance of SP6.5 Uveal Melanoma Cells toward Cisplatin.” *International journal of oncology* 26(2): 405–13.
- Bessette, D.C., Qiu, D. & Pallen, C.J., 2008. PRL PTPs: mediators and markers of cancer progression. *Cancer and Metastasis Reviews*, 27(2), pp.231–252.
- Bessette, D.C., Wong, P.C.W. & Pallen, C.J., 2007. PRL-3: a metastasis-associated phosphatase in search of a function. *Cells, tissues, organs*, 185(1–3), pp.232–6.
- Bledzka, K. et al., 2010. Tyrosine Phosphorylation of Integrin $\alpha 3$ Regulates Kindlin-2 Binding and Integrin Activation. *Journal of Biological Chemistry*, 285(40), pp.30370–30374.
- Boissy, R.E. & Hornyak, T.J., 2007. Extracutaneous Melanocytes. In *The Pigmentary System: Physiology and Pathophysiology: Second Edition*. Oxford, UK: Blackwell Publishing Ltd, pp. 91–107.
- Bosch, T. Van Den, 2012. *Genetic Prognostic Factors and Follow-up in Uveal Melanoma*,
- Van Den Bosch, T. et al., 2010. Genetics of uveal melanoma and cutaneous melanoma: Two of a kind? *Dermatology Research and Practice*, 2010(1).
- Boukerche, H. et al., 2008. mda-9/Syntenin promotes metastasis in human melanoma cells by activating c-Src. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(41), pp.15914–9.
- Bouvard, D. et al., 2013. Integrin inactivators: balancing cellular functions in vitro and in vivo. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 14(7), pp.430–42.
- Brooks, P.C. et al., 1998. Disruption of angiogenesis by PEX, a noncatalytic metalloproteinase fragment with integrin binding activity. *Cell*, 92(3), pp.391–400.
- Brooks, P.C. et al., 1996. Localization of matrix metalloproteinase MMP-2 to the surface of invasive cells by interaction with integrin $\alpha 5\beta 1$. *Cell*, 85(5), pp.683–693.
- Broyl, A. et al., 2010. Gene expression profiling for molecular classification of multiple myeloma in newly diagnosed patients. *Blood*, 116(14), pp.2543–53.
- Burke, T.R. & Zhang, Z.-Y., 1998. Protein-tyrosine phosphatases: Structure, mechanism, and inhibitor discovery. *Biopolymers*, 47(3), pp.225–241.
- Burridge, K. & Guilluy, C., 2015. Focal adhesions, stress fibers and mechanical tension. *Experimental Cell Research*, 343(1), pp.14–20.
- Butler, G.S. et al., 1998. The TIMP2 membrane type 1 metalloproteinase “receptor” regulates the concentration and efficient activation of progelatinase A. A kinetic study. *The Journal of biological chemistry*, 273(2), pp.871–80.
- Calipel, A. et al., 2006. Extracellular signal-regulated kinase-dependent proliferation is mediated through the protein kinase A/B-Raf pathway in human uveal melanoma cells. *The Journal of biological chemistry*, 281(14), pp.9238–50.

- Campbell, I.D. & Humphries, M.J., 2011. Integrin structure, activation, and interactions. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 3(3), p.a004994-.
- Capoccia, E. et al., 2015. S100B-p53 disengagement by pentamidine promotes apoptosis and inhibits cellular migration via aquaporin-4 and metalloproteinase-2 inhibition in C6 glioma cells. *Oncology Letters*, 9(6), pp.2864–70.
- Carita, G. et al., 2016. Dual inhibition of protein kinase C and p53-MDM2 or PKC and mTORC1 are novel efficient therapeutic approaches for uveal melanoma. *Oncotarget*, 7(23), pp.33542–56.
- Carter, D.A., 1998. Expression of a novel rat protein tyrosine phosphatase gene. *Biochimica et biophysica acta*, 1442(2–3), pp.405–8.
- Carvajal, R.D. et al., 2016. Metastatic disease from uveal melanoma: treatment options and future prospects. *The British journal of ophthalmology*, p.bjophthalmol-2016-309034.
- Cary, L.A., Chang, J.F. & Guan, J.L., 1996. Stimulation of cell migration by overexpression of focal adhesion kinase and its association with Src and Fyn. *Journal of cell science*, 109 (Pt 7), pp.1787–94.
- Case, L.B. & Waterman, C.M., 2015. Integration of actin dynamics and cell adhesion by a three-dimensional, mechanosensitive molecular clutch. *Nature cell biology*, 17(8), pp.955–963.
- Cassoux, N. et al., 2014. Genome-wide profiling is a clinically relevant and affordable prognostic test in posterior uveal melanoma. *The British journal of ophthalmology*, 98(6), pp.769–74.
- Cates, C.A. et al., 1996. Prenylation of oncogenic human PTP(CAAX) protein tyrosine phosphatases. *Cancer letters*, 110(1–2), pp.49–55.
- Di Cesare, S. et al., 2007. Expression and migratory analysis of 5 human uveal melanoma cell lines for CXCL12, CXCL8, CXCL1, and HGF. *Journal of carcinogenesis*, 6(1), p.2.
- Chan, K.T., Bennin, D.A. & Huttenlocher, A., 2010. Regulation of Adhesion Dynamics by Calpain-mediated Proteolysis of Focal Adhesion Kinase (FAK). *Journal of Biological Chemistry*, 285(15), pp.11418–11426.
- Chana, J.S. et al., 1999. c-myc, p53, and Bcl-2 expression and clinical outcome in uveal melanoma. *The British journal of ophthalmology*, 83(1), pp.110–4.
- Chang, D.D. et al., 1997. ICAP-1, a novel $\beta 1$ integrin cytoplasmic domain-associated protein, binds to a conserved and functionally important NPXY sequence motif of $\beta 1$ integrin. *Journal of Cell Biology*, 138(5), pp.1149–1157.
- Chao, W.-T. & Kunz, J., 2009. Focal adhesion disassembly requires clathrin-dependent endocytosis of integrins. *FEBS Letters*, 583(8), pp.1337–1343.
- Chen, W. et al., 2017. Tumor-Related Exosomes Contribute to Tumor-Promoting Microenvironment: An Immunological Perspective. *Journal of Immunology Research*, 2017, pp.1–10.
- Chen, W.T. & Wang, J.Y., 1999. Specialized surface protrusions of invasive cells, invadopodia and lamellipodia, have differential MT1-MMP, MMP-2, and TIMP-2 localization. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 878, pp.361–71.
- Chen, X. et al., 2013. Combined PKC and MEK inhibition in uveal melanoma with GNAQ and GNA11 mutations. *Oncogene*, 33, pp.4724–4734.
- Chen, X. et al., 2017. RasGRP3 Mediates MAPK Pathway Activation in GNAQ Mutant Uveal Melanoma. *Cancer Cell*, 31(5), p.685–696.e6.
- Cheung, M. et al., 2013. Further evidence for germline BAP1 mutations predisposing to melanoma and malignant mesothelioma. *Cancer Genetics*, 206(5), pp.206–210.
- Choi, C.K. et al., 2008. Actin and alpha-actinin orchestrate the assembly and maturation of nascent adhesions in a myosin II motor-independent manner. *Nature cell biology*, 10(9), pp.1039–50.
- Choi, H.S. et al., 2009. Poly(C)-binding proteins as transcriptional regulators of gene expression. *Biochemical and biophysical research communications*, 380(3), pp.431–6.
- Choi, M.S. et al., 2011. The essential role of FKBP38 in regulating phosphatase of regenerating liver 3 (PRL-3) protein stability. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 406(2), pp.305–309.

- Choi, S.-K. et al., 2006. Biflavonoids inhibited phosphatase of regenerating liver-3 (PRL-3). *Natural Product Research*, 20(4), pp.341–346.
- Cirillo, C. et al., 2015. S100B Inhibitor Pentamidine Attenuates Reactive Gliosis and Reduces Neuronal Loss in a Mouse Model of Alzheimer's Disease. *BioMed research international*, 2015, p.508342. type=abstract.
- Le Clainche, C. & Carlier, M.-F., 2008. Regulation of Actin Assembly Associated With Protrusion and Adhesion in Cell Migration. *Physiological Reviews*, 88(2), pp.489–513.
- Colello, R.J. & Jeffery, G., 1991. Evaluation of the influence of optic stalk melanin on the chiasmatic pathways in the developing rodent visual system. *The Journal of comparative neurology*, 305(2), pp.304–12.
- Coupland, S.E. et al., 1998. Expression patterns of cyclin D1 and related proteins regulating G1-S phase transition in uveal melanoma and retinoblastoma. *The British journal of ophthalmology*, 82(8), pp.961–70.
- Coupland, S.E. et al., 2000. The prognostic value of cyclin D1, p53, and MDM2 protein expression in uveal melanoma. *The Journal of pathology*, 191(2), pp.120–6.
- Coupland, S.E., Campbell, I. & Damato, B., 2008. Routes of Extraocular Extension of Uveal Melanoma. *Ophthalmology*, 115(10), pp.1778–1785.
- Cramer, L.P., 1997. Molecular mechanism of actin-dependent retrograde flow in lamellipodia of motile cells. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library*, 2, pp.d260–70.
- Creel, D.J., Summers, C.G. & King, R.A., 1990. Visual anomalies associated with albinism. *Ophthalmic Paediatrics and Genetics*, 11(3), pp.193–200.
- Damato, B. et al., 2007. Cytogenetics of uveal melanoma: a 7-year clinical experience. *Ophthalmology*, 114(10), pp.1925–31.
- Damato, B., 2006. Treatment of primary intraocular melanoma. *Expert review of anticancer therapy*, 6(4), pp.493–506.
- Damato, B., Dopierala, J.A. & Coupland, S.E., 2010. Genotypic Profiling of 452 Choroidal Melanomas with Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification. *Clinical Cancer Research*, 16(24)..
- Damato, E.M. & Damato, B.E., 2012. Detection and Time to Treatment of Uveal Melanoma in the United Kingdom: An Evaluation of 2384 Patients. *Ophthalmology*, 119(8), pp.1582–1589.
- Daouti, S. et al., 2008. A selective phosphatase of regenerating liver phosphatase inhibitor suppresses tumor cell anchorage-independent growth by a novel mechanism involving p130Cas cleavage. *Cancer research*, 68(4), pp.1162–9.
- Das, S. et al., 2008. Rapid expression and activation of MMP-2 and MMP-9 upon exposure of human breast cancer cells (MCF-7) to fibronectin in serum free medium. *Life Sciences*, 82(9–10), pp.467–476.
- Debra L. Nickla and Josh Wallman, 2010. The multifunctional choroid. *Prog Retin Eye Res*, 29(2), pp.144–168.
- Decatur, C.L. et al., 2016. Driver Mutations in Uveal Melanoma: Associations With Gene Expression Profile and Patient Outcomes. *JAMA Ophthalmology*, 134(7), pp.728–733.
- Delaney, S.P., Julian, L.M. & Stanford, W.L., 2014. The neural crest lineage as a driver of disease heterogeneity in Tuberous Sclerosis Complex and Lymphangiomyomatosis. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 2, p.69.
- Desgrosellier, J.S. & Cheresch, D. a, 2010. Integrins in cancer: biological implications and therapeutic opportunities. *Nature reviews. Cancer*, 10(1), pp.9–22.
- Diamond, R.H. et al., 1996. Expression of PRL-1 nuclear PTPase is associated with proliferation in liver but with differentiation in intestine. *The American journal of physiology*, 271(1 Pt 1), pp.G121-9.
- Diamond, R.H. et al., 1994. PRL-1, a unique nuclear protein tyrosine phosphatase, affects cell growth. *Molecular and cellular biology*, 14(6), pp.3752–62.
- Dithmar, S., Diaz, C.E. & Grossniklaus, H.E., 2000. Intraocular melanoma spread to regional lymph nodes: report of two cases. *Retina (Philadelphia, Pa.)*, 20(1), pp.76–9.

- Dong, Y. et al., 2014. Phosphatase of Regenerating Liver 2 (PRL2) Deficiency Impairs Kit Signaling and Spermatogenesis. *Journal of Biological Chemistry*, 289(6), pp.3799–3810.
- Dong, Y. et al., 2012. 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. *Journal of Biological Chemistry*, 287(38), pp.32172–32179.
- Le Douarin, N. & Kalcheim, C., 1999. *The neural crest*, Cambridge University Press.
- Duband, J.-L., 2010. Diversity in the molecular and cellular strategies of epithelium-to-mesenchyme transitions: Insights from the neural crest. *Cell adhesion & migration*, 4(3), pp.458–82.
- Duband, J.-L., 2006. Neural Crest Delamination and Migration. In *Neural Crest Induction and Differentiation*. Boston, MA: Springer US, pp. 45–77.
- Dubash, A.D. et al., 2007. A novel role for Lsc/p115 RhoGEF and LARG in regulating RhoA activity downstream of adhesion to fibronectin. *Journal of Cell Science*, 120(22), pp.3989–3998.
- Dulbecco, 1997. Encyclopedia of Human Biology: Si-Z - Page 597. , p.812.
- Economou, M.A. et al., 2005. Receptors for the Liver Synthesized Growth Factors IGF-1 and HGF/SF in Uveal Melanoma: Intercorrelation and Prognostic Implications. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 46(12), p.4372.
- Ehlers, J.P. et al., 2005. DDEF1 is located in an amplified region of chromosome 8q and is overexpressed in uveal melanoma. *Clinical Cancer Research*, 11(10), pp.3609–3613.
- Ehlers, J.P. et al., 2008. Integrative Genomic Analysis of Aneuploidy in Uveal Melanoma. , 14(1), pp.115–123.
- Ehlers, J.P. & Harbour, J.W., 2005. NBS1 Expression as a Prognostic Marker in Uveal Melanoma. *Clin. Cancer Res.*, 11(5), pp.1849–1853.
- Eldh, M. et al., 2014. MicroRNA in exosomes isolated directly from the liver circulation in patients with metastatic uveal melanoma. *BMC Cancer*, 14(1), p.962.
- Eletr, Z.M. & Wilkinson, K.D., 2011. An emerging model for BAP1's role in regulating cell cycle progression. *Cell biochemistry and biophysics*, 60(1–2), pp.3–11.
- Elner, S.G. & Elner, V.M., 1996. The integrin superfamily and the eye. *Investigative ophthalmology & visual science*, 37(5), pp.696–701.
- Elshaw, S.R. et al., 2001. A comparison of ocular melanocyte and uveal melanoma cell invasion and the implication of alpha1beta1, alpha4beta1 and alpha6beta1 integrins. *The British journal of ophthalmology*, 85(6), pp.732–8.
- von Euw, E. et al., 2012. Antitumor effects of the investigational selective MEK inhibitor TAK733 against cutaneous and uveal melanoma cell lines. *Molecular Cancer*, 11(1), p.22.
- Ezratty, E.J. et al., 2009. Clathrin mediates integrin endocytosis for focal adhesion disassembly in migrating cells. *The Journal of cell biology*, 187(5), pp.733–47.
- Fagerli, U.-M. et al., 2008. Overexpression and involvement in migration by the metastasis-associated phosphatase PRL-3 in human myeloma cells. *Blood*, 111(2), pp.806–15.
- Fagone, P. et al., 2017. Identification of novel chemotherapeutic strategies for metastatic uveal melanoma. *Scientific Reports*, 7, p.44564.
- Fang, X.-Y. et al., 2015. PRL-3 Promotes the Malignant Progression of Melanoma via Triggering Dephosphorylation and Cytoplasmic Localization of NHERF1. *Journal of Investigative Dermatology*, 135(9), pp.2273–2282.
- Feng, X. et al., 2014. Hippo-independent activation of YAP by the GNAQ uveal melanoma oncogene through a Trio-regulated Rho GTPase Signaling Circuitry. *Cancer Cell*, 25(6).
- Field, M.G. et al., 2016. Biology of Human Tumors PRAME as an Independent Biomarker for Metastasis in Uveal Melanoma. *Clin Cancer Res*, 22(5), pp.1234–42.
- Fiordalisi, J.J. et al., 2013. Src-Mediated Phosphorylation of the Tyrosine Phosphatase PRL-3 Is Required for PRL-3 Promotion of Rho Activation, Motility and Invasion J. W. Lee, ed. *PLoS ONE*, 8(5), p.e64309.

- Fiordalisi, J.J., Keller, P.J. & Cox, A.D., 2006. PRL tyrosine phosphatases regulate Rho family GTPases to promote invasion and motility. *Cancer Research*, 66(6), pp.3153–3161.
- Flanigan, T.L. et al., 2009. The effects of increased extracellular deformation, pressure, and integrin phosphorylation on fibroblast migration. *The Journal of surgical research*, 156(1), pp.103–9.
- Forte, E. et al., 2008. Ezrin is a specific and direct target of protein tyrosine phosphatase PRL-3. *Biochimica et biophysica acta*, 1783(2), pp.334–44.
- Franco, S.J. et al., 2004. Calpain-mediated proteolysis of talin regulates adhesion dynamics. *Nature Cell Biology*, 6(10), pp.977–983.
- Friedl, P. & Bröcker, E.B., 2000. The biology of cell locomotion within three-dimensional extracellular matrix. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 57(1), pp.41–64.
- Friedl, P. & Wolf, K., 2010. Plasticity of cell migration: A multiscale tuning model. *Journal of Cell Biology*, 188(1), pp.11–19.
- Friedl, P. & Wolf, K., 2003. Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms. *Nature reviews. Cancer*, 3(5), pp.362–74.
- Furge, K.A., Zhang, Y.-W. & Vande Woude, G.F., 2000. Met receptor tyrosine kinase: enhanced signaling through adapter proteins. *Oncogene*, 19(49), pp.5582–5589.
- Gajewski, T.F. et al., 2012. Phase II study of the farnesyltransferase inhibitor R115777 in advanced melanoma (CALGB 500104). *Journal of translational medicine*, 10(1), p.246.
- Galbraith, C.G., Yamada, K.M. & Sheetz, M.P., 2002. The relationship between force and focal complex development. *The Journal of cell biology*, 159(4), pp.695–705.
- Gálvez, B.G. et al., 2002. ECM regulates MT1-MMP localization with beta1 or alphavbeta3 integrins at distinct cell compartments modulating its internalization and activity on human endothelial cells. *The Journal of cell biology*, 159(3), pp.509–21.
- Gammill, L.S. & Bronner-Fraser, M., 2003. Neural crest specification: migrating into genomics. *Nature reviews. Neuroscience*, 4(10), pp.795–805.
- Gangemi, R. et al., 2012. Mda-9/syntenin is expressed in uveal melanoma and correlates with metastatic progression. *PLoS ONE*, 7(1).
- Geiger, B., Spatz, J.P. & Bershadsky, A.D., 2009. Environmental sensing through focal adhesions. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 10(1), pp.21–33.
- Geiger, B. & Yamada, K.M., 2011. Molecular Architecture and Function of Matrix Adhesions. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 3(5), pp.a005033–a005033.
- Giancotti, F.G. & Tarone, G., 2003. Positional control of cell fate through joint integrin/receptor protein kinase signaling. *Annual review of cell and developmental biology*, 19(1), pp.173–206.
- Girnita, A. et al., 2004. Cyclolignans as Inhibitors of the Insulin-Like Growth Factor-1 Receptor and Malignant Cell Growth. *Cancer Research*, 64(1), pp.236–242.
- Girnita, A. et al., 2008. The insulin-like growth factor-I receptor inhibitor picropodophyllin causes tumor regression and attenuates mechanisms involved in invasion of uveal melanoma cells. *Acta Ophthalmologica*, 86, pp.26–34.
- Guo, K. et al., 2004. Catalytic domain of PRL-3 plays an essential role in tumor metastasis: formation of PRL-3 tumors inside the blood vessels. *Cancer biology & therapy*, 3(10), pp.945–51.
- Guo, K. et al., 2006. PRL-3 initiates tumor angiogenesis by recruiting endothelial cells in vitro and in vivo. *Cancer Research*.
- Guo, W. & Giancotti, F.G., 2004. Integrin signalling during tumour progression. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 5(10), pp.816–826.
- Han, Y.-M. et al., 2012. Emodin inhibits migration and invasion of DLD-1 (PRL-3) cells via inhibition of PRL-3 phosphatase activity. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 22(1), pp.323–6.
- Hanahan, D. & Weinberg, R. a, 2011. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5), pp.646–74.
- Harbour, J.W. et al., 2010. Frequent mutation of BAP1 in metastasizing uveal melanomas. *Science (New York, N.Y.)*, 330(6009), pp.1410–3.

- Harbour, J.W. et al., 2013. Recurrent mutations at codon 625 of the splicing factor SF3B1 in uveal melanoma. *Nature genetics*, 45(2), pp.133–5.
- Harbour, J.W., 2012. The genetics of uveal melanoma: an emerging framework for targeted therapy. *Pigment cell & melanoma research*, 25(2), pp.171–81.
- Hardy, S. et al., 2010. Overexpression of the Protein Tyrosine Phosphatase PRL-2 Correlates with Breast Tumor Formation and Progression. *Cancer Research*, 70(21), pp.8959–8967.
- Hassan, N.M.M. et al., 2011. Increased expression of the PRL-3 gene in human oral squamous cell carcinoma and dysplasia tissues. *Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP*, 12(4), pp.947–51.
- Hastie, E.L. & Sherwood, D.R., 2016. A new front in cell invasion: The invadopodial membrane. *European Journal of Cell Biology*, 95(11), pp.441–448.
- Helgadottir, H. & H??iom, V., 2016. The genetics of uveal melanoma: Current insights. *Application of Clinical Genetics*, 9, pp.147–155.
- Helmke, B.M. et al., 2004. Melanoma metastasis is associated with enhanced expression of the syntenin gene. *Oncology reports*, 12(2), pp.221–8.
- Henriquez, F. et al., 2007. The T1799A BRAF mutation is present in iris melanoma. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 48(11), pp.4897–4900.
- Hildebrand, J.D., Taylor, J.M. & Parsons, J.T., 1996. An SH3 domain-containing GTPase-activating protein for Rho and Cdc42 associates with focal adhesion kinase. *Molecular and cellular biology*, 16(6), pp.3169–78.
- den Hollander, P. et al., 2016. Phosphatase PTP4A3 Promotes Triple-Negative Breast Cancer Growth and Predicts Poor Patient Survival. *Cancer Research*, 76(7).
- Hollstein, M. et al., 1991. p53 mutations in human cancers. *Science (New York, N.Y.)*, 253(5015), pp.49–53.
- Hoshino, A. et al., 2015. Tumour exosome integrins determine organotropic metastasis.
- Hoshino, D., Branch, K.M. & Weaver, A.M., 2013. Signaling inputs to invadopodia and podosomes. *Journal of Cell Science*, 126(14), pp.2979–2989.
- Hsu, M.Y. et al., 1998. Adenoviral gene transfer of beta3 integrin subunit induces conversion from radial to vertical growth phase in primary human melanoma. *The American journal of pathology*, 153(5), pp.1435–42.
- Huang, Y.-H. et al., 2014. A role of autophagy in PTP4A3-driven cancer progression. *Autophagy*, 10(10), pp.1787–800.
- Hughes, S. et al., 2005. Microarray comparative genomic hybridisation analysis of intraocular uveal melanomas identifies distinctive imbalances associated with loss of chromosome 3. *British Journal of Cancer*, 93(10), pp.1191–1196.
- Humphries, J.D. et al., 2007. Vinculin controls focal adhesion formation by direct interactions with talin and actin. *The Journal of Cell Biology*, 179(5), pp.1043–1057.
- Hynes, R.O., 1987. Integrins: A family of cell surface receptors. *Cell*, 48(4), pp.549–554.
- Hynes, R.O., 2002. Integrins: Bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell*, 110(6), pp.673–687.
- Ibrahim, N. & Haluska, F.G., 2009. Molecular Pathogenesis of Cutaneous Melanocytic Neoplasms. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 4(1), pp.551–579.
- Ilić, D. et al., 1995. Reduced cell motility and enhanced focal adhesion contact formation in cells from FAK-deficient mice. *Nature*, 377(6549), pp.539–44.
- Inagaki, N. & Katsuno, H., 2017. Actin Waves: Origin of Cell Polarization and Migration? *Trends in Cell Biology*, 27(7), pp.515–526.
- Ishii, T., Funato, Y. & Miki, H., 2013. Thioredoxin-related protein 32 (TRP32) specifically reduces oxidized phosphatase of regenerating liver (PRL). *The Journal of biological chemistry*, 288(10), pp.7263–70.
- Jay, V. et al., 1996. Expression of bcl-2 in uveal malignant melanoma. *Archives of pathology &*

- laboratory medicine*, 120(5), pp.497–8.
- Jeong, D.G. et al., 2005. Trimeric Structure of PRL-1 Phosphatase Reveals an Active Enzyme Conformation and Regulation Mechanisms. *Journal of Molecular Biology*, 345(2), pp.401–413.
- Jiang, Y. et al., 2011. Phosphatase PRL-3 is a direct regulatory target of TGFbeta in colon cancer metastasis. *Cancer research*, 71(1), pp.234–44.
- Johansson, P. et al., 2016. Deep sequencing of uveal melanoma identifies a recurrent mutation in PLCB4. *Oncotarget*, 7(4), pp.4624–31.
- Kalluri, R., 2003. Basement membranes: structure, assembly and role in tumour angiogenesis. *Nature reviews. Cancer*, 3(6), pp.422–33.
- Kato, H. et al., 2004. High expression of PRL-3 promotes cancer cell motility and liver metastasis in human colorectal cancer: a predictive molecular marker of metachronous liver and lung metastases. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 10(21), pp.7318–28.
- Kiema, T. et al., 2006. The molecular basis of filamin binding to integrins and competition with talin. *Molecular cell*, 21(3), pp.337–47.
- Kilic, E. et al., 2006. Clinical and Cytogenetic Analyses in Uveal Melanoma. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 47(9), p.3703.
- Kim, K. et al., 2004. Structure of human PRL-3 , the phosphatase associated with cancer metastasis. , 565, pp.181–187.
- Kobayashi, J. et al., 2010. Bisbenzamidine derivative, pentamidine represses DNA damage response through inhibition of histone H2A acetylation. *Molecular cancer*, 9, p.34.
- Kobayashi, M. et al., 2014. PRL2/PTP4A2 Phosphatase Is Important for Hematopoietic Stem Cell Self-Renewal. *STEM CELLS*, 32(7), pp.1956–1967.
- Kong, L. et al., 2007. The value and correlation between PRL-3 expression and matrix metalloproteinase activity and expression in human gliomas. *Neuropathology*, 27(6), pp.516–521. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18021371> [Accessed May 12, 2017].
- Kong, W. et al., 2000. PRL-1 PTPase expression is developmentally regulated with tissue-specific patterns in epithelial tissues. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology*, 279(3), pp.G613-21.
- Konstantinopoulos, P.A., Karamouzis, M. V. & Papavassiliou, A.G., 2007. Post-translational modifications and regulation of the RAS superfamily of GTPases as anticancer targets. *Nature Reviews Drug Discovery*, 6(7), pp.541–555.
- Kozlov, G. et al., 2004. Structural Insights into Molecular Function of the Metastasis-associated Phosphatase PRL-3. *Journal of Biological Chemistry*, 279(12), pp.11882–11889.
- Krndija, D. et al., 2012. The phosphatase of regenerating liver 3 (PRL-3) promotes cell migration through Arf-activity-dependent stimulation of integrin $\alpha 5$ recycling. *Journal of cell science*, 125(Pt 16), pp.3883–92.
- Kuo, J.-C. et al., 2011. Analysis of the myosin-II-responsive focal adhesion proteome reveals a role for β -Pix in negative regulation of focal adhesion maturation. *Nature Cell Biology*, 13(4), pp.383–393.
- Kuo, J.-C., 2013. Mechanotransduction at focal adhesions: integrating cytoskeletal mechanics in migrating cells. *Journal of cellular and molecular medicine*, XX(X), pp.1–9.
- Ladoux, B., Mège, R.M. & Trepât, X., 2016. Front-Rear Polarization by Mechanical Cues: From Single Cells to Tissues. *Trends in Cell Biology*, 26(6), pp.420–433.
- Landreville, S. et al., 2011. Suppression of $\alpha 5$ gene expression is closely related to the tumorigenic properties of uveal melanoma cell lines. *Pigment cell & melanoma research*, 24(4), pp.643–55.
- Laurence, J.S., Hallenga, K. & Stauffacher, C. V., 2004. ^1H , ^{15}N , ^{13}C resonance assignments of the human protein tyrosine phosphatase PRL-1. *Journal of biomolecular NMR*, 29(3), pp.417–8.
- Laurent, C. et al., 2011. High PTP4A3 phosphatase expression correlates with metastatic risk in uveal melanoma patients. *Cancer research*, 71(3), pp.666–74.

- Laurent, C. et al., 2013. Patient-derived xenografts recapitulate molecular features of human uveal melanomas. *Molecular Oncology*, 7(3), pp.625–636.
- Law, D.A. et al., 1999. Integrin cytoplasmic tyrosine motif is required for outside-in α IIb β 3 signalling and platelet function. *Nature*, 401(6755), pp.808–11.
- Lee, S.K. et al., 2012. Phosphatase of regenerating liver-3 promotes migration and invasion by upregulating matrix metalloproteinases-7 in human colorectal cancer cells. *International Journal of Cancer*, 131(3), pp.E190–203.
- Legate, K.R. & Fässler, R., 2009. Mechanisms that regulate adaptor binding to beta-integrin cytoplasmic tails. *Journal of cell science*, 122(Pt 2), pp.187–98.
- Lerner, E.C. et al., 1995. Ras CAAX peptidomimetic FTI-277 selectively blocks oncogenic Ras signaling by inducing cytoplasmic accumulation of inactive Ras-Raf complexes. *Journal of Biological Chemistry*, 270(45), pp.26802–26806.
- Li, H. et al., 2009. Inhibition of chemokine receptor expression on uveal melanomas by CXCR4 siRNA and its effect on uveal melanoma liver metastases. *Investigative ophthalmology & visual science*, 50(12), pp.5522–8.
- Li, Z. et al., 2012. MiR-495 and miR-551a inhibit the migration and invasion of human gastric cancer cells by directly interacting with PRL-3. *Cancer Letters*, 323(1), pp.41–47.
- Lian, S. et al., 2016. PRL-3 promotes cell adhesion by interacting with JAM2 in colon cancer. *Oncology letters*, 12(3), pp.1661–1666.
- Lian, S. et al., 2017. PRL-3 promotes telomere deprotection and chromosomal instability. *Nucleic Acids Research*, 45(11), pp.6546–6571.
- Liang, F., Liang, J., et al., 2007. PRL3 promotes cell invasion and proliferation by down-regulation of Csk leading to Src activation. *The Journal of biological chemistry*, 282(8), pp.5413–9.
- Liang, F., Luo, Y., Dong, Y., Walls, C.D., et al., 2008. Translational control of C-terminal Src kinase (Csk) expression by PRL3 phosphatase. *Journal of Biological Chemistry*, 283(16), pp.10339–10346.
- Liang, F., Luo, Y., Dong, Y., Walls, C.D., et al., 2008. Translational control of C-terminal Src kinase (Csk) expression by PRL3 phosphatase. *The Journal of biological chemistry*, 283(16), pp.10339–46.
- Liang, F., Kumar, S. & Zhang, Z.-Y., 2007. Proteomic approaches to studying protein tyrosine phosphatases. *Molecular bioSystems*, 3(5), pp.308–16.
- Lim, Y. et al., 2008. PyK2 and FAK connections to p190Rho guanine nucleotide exchange factor regulate RhoA activity, focal adhesion formation, and cell motility. *The Journal of Cell Biology*, 180(1), pp.187–203.
- Lin, M.-D. et al., 2013. Expression of phosphatase of regenerating liver family genes during embryogenesis: an evolutionary developmental analysis among *Drosophila*, amphioxus, and zebrafish. *BMC developmental biology*, 13(1), p.18.
- Lin, S. et al., 2016. Phosphatase of regenerating liver-3 inhibits invasiveness and proliferation in non-small cell lung cancer by regulating the epithelial-mesenchymal transition. *Oncotarget*, 7(16), pp.21799–21811.
- Liotta, L.A. & Kohn, E.C., 2001. The microenvironment of the tumour-host interface. *Nature*, 411(6835), pp.375–9.
- Liu, Y. et al., 2009. PRL-3 promotes epithelial mesenchymal transition by regulating cadherin directly. *Cancer Biology and Therapy*, 8(14), pp.1352–1359.
- Liu, Y.-Q. et al., 2008. Expression of phosphatase of regenerating liver 1 and 3 mRNA in esophageal squamous cell carcinoma. *Archives of pathology & laboratory medicine*, 132(8), pp.1307–12.
- Luke, J.J. et al., 2014. Biology of advanced uveal melanoma and next steps for clinical therapeutics. *Pigment Cell and Melanoma Research*, 28(2), pp 135–147.
- Luo, Y., Liang, F. & Zhang, Z.-Y., 2009. PRL1 promotes cell migration and invasion by increasing MMP2 and MMP9 expression through Src and ERK1/2 pathways. *Biochemistry*, 48(8), pp.1838–46.

- Ma, Y. & Li, B., 2011. Expression of phosphatase of regenerating liver-3 in squamous cell carcinoma of the cervix. *Medical oncology (Northwood, London, England)*, 28(3), pp.775–80.
- Maacha, S. et al., 2013. Protein tyrosine phosphatase 4A3 (PTP4A3) is required for *Xenopus laevis* cranial neural crest migration in vivo. *PloS one*, 8(12), p.e84717. e=abstract [Accessed January 13, 2016].
- Machida, Y.J. et al., 2009. The Deubiquitinating Enzyme BAP1 Regulates Cell Growth via Interaction with HCF-1. *Journal of Biological Chemistry*, 284(49), pp.34179–34188.
- Mahipal, A. et al., 2012. A pilot study of sunitinib malate in patients with metastatic uveal melanoma. *Melanoma Research*, 22(6), pp.440–446.
- Maity, G. et al., 2010. Fibronectin?integrin mediated signaling in human cervical cancer cells (SiHa). *Molecular and Cellular Biochemistry*, 336(1–2), pp.65–74.
- Maity, G., Sen, T. & Chatterjee, A., 2011. Laminin induces matrix metalloproteinase-9 expression and activation in human cervical cancer cell line (SiHa). *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 137(2), pp.347–357.
- Mäkitie, T. et al., 2001. Ezrin as a prognostic indicator and its relationship to tumor characteristics in uveal malignant melanoma. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 42(11), pp.2442–2449.
- Mallikarjuna, K. et al., 2013. Expression of Epidermal Growth Factor Receptor: Risk Factor in Uveal Melanoma. *Current eye research*, 32(3), pp.1–5.
- Margadant, C. et al., 2011. Mechanisms of integrin activation and trafficking. *Current opinion in cell biology*, 23(5), pp.607–14.
- Marshall, J. et al., 1998. Comparative analysis of integrins in vitro and in vivo in uveal and cutaneous melanomas. *British Journal of Cancer*, 77(4), pp.522–529.
- Martin, M. et al., 2013. Exome sequencing identifies recurrent somatic mutations in EIF1AX and SF3B1 in uveal melanoma with disomy 3. *Nature genetics*, 45(8), pp.933–6.
- Matter, W.F. et al., 2001. Role of PRL-3, a human muscle-specific tyrosine phosphatase, in angiotensin-II signaling. *Biochemical and biophysical research communications*, 283(5), pp.1061–8.
- McParland, V. et al., 2011. The metastasis-promoting phosphatase PRL-3 shows activity toward phosphoinositides. *Biochemistry*, 50(35), pp.7579–7590.
- Michaelson, D. et al., 2001. Differential localization of Rho GTPases in live cells: regulation by hypervariable regions and RhoGDI binding. *The Journal of cell biology*, 152(1), pp.111–26.
- Min, G. et al., 2013. Rhodanine-based PRL-3 inhibitors blocked the migration and invasion of metastatic cancer cells. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 23(13), pp.3769–74.
- Min, S.-H. et al., 2010. Downregulation of p53 by phosphatase of regenerating liver 3 is mediated by MDM2 and PIRH2. *Life Sciences*, 86(1), pp.66–72.
- Ming, J. et al., 2009. 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(2), pp.118–26.
- Misaghi, S. et al., 2009. Association of C-terminal ubiquitin hydrolase BRCA1-associated protein 1 with cell cycle regulator host cell factor 1. *Molecular and cellular biology*, 29(8), pp.2181–92.
- Miskad, U.A. et al., 2004. Expression of PRL-3 Phosphatase in Human Gastric Carcinomas: Close Correlation with Invasion and Metastasis. *Pathobiology*, 71(4), pp.176–184.
- Miskad, U.A. et al., 2007. High PRL-3 expression in human gastric cancer is a marker of metastasis and grades of malignancies: An in situ hybridization study. *Virchows Archiv*, 450(3), pp.303–310.
- Mitra, S.K. & Schlaepfer, D.D., 2006. Integrin-regulated FAK-Src signaling in normal and cancer cells. *Current opinion in cell biology*, 18(5), pp.516–23.
- Mizuuchi, E. et al., 2009. Down-modulation of keratin 8 phosphorylation levels by PRL-3 contributes to colorectal carcinoma progression. *International Journal of Cancer*, 124(8), pp.1802–1810.
- Mohn, K.L. et al., 1991. The gene encoding rat insulinlike growth factor-binding protein 1 is rapidly and highly induced in regenerating liver. *Molecular and cellular biology*, 11(3), pp.1393–1401.

- Montagna, M. et al., 1996. Localization of the human phosphotyrosine phosphatase-related genes (h-PRL-1) to chromosome bands 1p35-p34, 17q12-q21, 11q24-q25 and 12q24. *Human genetics*, 98(6), pp.738–40.
- Moore, A.R. et al., 2016. Recurrent activating mutations of G-protein-coupled receptor CYSLTR2 in uveal melanoma. *Nature genetics*, advance on(6), pp.675–680.
- Mori, H. et al., 2013. Transmembrane/cytoplasmic, rather than catalytic, domains of Mmp14 signal to MAPK activation and mammary branching morphogenesis via binding to integrin β 1. *Development (Cambridge, England)*, 140(2), pp.343–52.
- Moser, M. et al., 2008. Kindlin-3 is essential for integrin activation and platelet aggregation. *Nature medicine*, 14(3), pp.325–30.
- Mouriaux, F. et al., 1999. [Waardenburg's syndrome]. *Journal francais d'ophtalmologie*, 22(7), pp.799–809.
- Mouriaux, F. et al., 2005. *Les mélanocytes choroïdiens normaux et malins : de la cellule à la clinique*, Masson.
- Mouriaux, F. et al., 2016. Sorafenib in metastatic uveal melanoma : efficacy , toxicity and health-related quality of life in a multicentre phase II study. *British Journal of Cancer*, 115(1), pp.20–24.
- Nagase, H., Visse, R. & Murphy, G., 2006. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovascular Research*, 69(3), pp.562–573.
- Nayman, T. et al., 2017. Uveal Melanoma Risk Factors: A Systematic Review of Meta-Analyses. *Current Eye Research*, pp.1–9.
- Nevo, J. et al., 2010. Mammary-derived growth inhibitor (MDGI) interacts with integrin α -subunits and suppresses integrin activity and invasion. *Oncogene*, 29(49), pp.6452–63..
- Nieswandt, B. et al., 2007. Loss of talin1 in platelets abrogates integrin activation, platelet aggregation, and thrombus formation in vitro and in vivo. *The Journal of experimental medicine*, 204(13), pp.3113–8.
- Nieves, B. et al., 2010. The NPIY motif in the integrin beta1 tail dictates the requirement for talin-1 in outside-in signaling. *Journal of cell science*, 123(Pt 8), pp.1216–26.
- Nilsson, S. et al., 2006. Threonine 788 in integrin subunit beta1 regulates integrin activation. *Experimental cell research*, 312(6), pp.844–53.
- Nishimura, T. & Kaibuchi, K., 2007. Numb Controls Integrin Endocytosis for Directional Cell Migration with aPKC and PAR-3. *Developmental Cell*, 13(1), pp.15–28.
- Noden, D.M., Poelmann, R.E. & Gittenberger-de Groot, A.C., 1995. Cell origins and tissue boundaries during outflow tract development. *Trends in cardiovascular medicine*, 5(2), pp.69–75.
- Onken, M.D. et al., 2010. An Accurate, Clinically Feasible Multi-Gene Expression Assay for Predicting Metastasis in Uveal Melanoma. *The Journal of Molecular Diagnostics*, 12(4), pp.461–468.
- Onken, M.D. et al., 2004. Gene Expression Profiling in Uveal Melanoma Reveals Two Molecular Classes and Predicts Metastatic Death. *CANCER RESEARCH*, 64, pp.7205–7209.
- Onken, M.D. et al., 2007. Loss of Heterozygosity of Chromosome 3 Detected with Single Nucleotide Polymorphisms Is Superior to Monosomy 3 for Predicting Metastasis in Uveal Melanoma. *Clinical Cancer Research*, 13(10), pp.2923–2927.
- Onken, M.D. et al., 2008. Oncogenic mutations in GNAQ occur early in uveal melanoma. *Investigative ophthalmology & visual science*, 49(12), pp.5230–4.
- Ooki, A. et al., 2010. Phosphatase of regenerating liver-3 as a convergent therapeutic target for lymph node metastasis in esophageal squamous cell carcinoma. *International journal of cancer*, 127(3), pp.543–54.
- Ooki, A. et al., 2011. Therapeutic potential of PRL-3 targeting and clinical significance of PRL-3 genomic amplification in gastric cancer. *BMC cancer*, 11(1), p.122.
- Orsatti, L. et al., 2009. 2-D difference in gel electrophoresis combined with Pro-Q Diamond staining: A successful approach for the identification of kinase/phosphatase targets. *Electrophoresis*, 30(14), pp.2469–2476.

- Östman, A., Hellberg, C. & Böhmer, F.D., 2006. Protein-tyrosine phosphatases and cancer. *Nature Reviews Cancer*, 6(4), pp.307–320.
- Owen, J.D. et al., 1999. Induced focal adhesion kinase (FAK) expression in FAK-null cells enhances cell spreading and migration requiring both auto- and activation loop phosphorylation sites and inhibits adhesion-dependent tyrosine phosphorylation of Pyk2. *Molecular and cellular biology*, 19(7), pp.4806–18.
- Oxley, C.L. et al., 2008. An integrin phosphorylation switch: The effect of $\beta 3$ integrin tail phosphorylation on Dok1 and talin binding. *Journal of Biological Chemistry*, 283(9), pp.5420–5426.
- Park, H. et al., 2008. Discovery of novel PRL-3 inhibitors based on the structure-based virtual screening. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 18(7), pp.2250–2255.
- Pascaru, M. et al., 2009. Analysis of molecular determinants of PRL-3. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 13(9 B), pp.3141–3150.
- Pathak, M.K. et al., 2002. Pentamidine is an inhibitor of PRL phosphatases with anticancer activity. *Molecular cancer therapeutics*, 1(14), pp.1255–64.
- Paul J. M. ten Berge et al., 1993. Integrin Expression in Uveal Melanoma Differs From Cutaneous Melanoma. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 34(13), pp.3635–3640.
- Pekka, K. & Jyrki, H., 2013. Integrins in Cancer Cell Invasion. , pp.1–23.
- Peng, L. et al., 2006. Identification of integrin $\beta 1$ as an interacting protein of protein tyrosine phosphatase PRL-3. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 342(1), pp.179–183.
- Peng, L. et al., 2009. PRL-3 promotes the motility, invasion, and metastasis of LoVo colon cancer cells through PRL-3-integrin $\beta 1$ -ERK1/2 and-MMP2 signaling. *Molecular cancer*, 8, p.110.
- Peng, L. et al., 2004. The association of the expression level of protein tyrosine phosphatase PRL-3 protein with liver metastasis and prognosis of patients with colorectal cancer. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 130(9), pp.521–6.
- Peruzzi, B. & Bottaro, D.P., 2006. Targeting the c-Met signaling pathway in cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 12(12), pp.3657–60.
- Petrich, B.G. et al., 2007. Talin is required for integrin-mediated platelet function in hemostasis and thrombosis. *The Journal of Experimental Medicine*, 204(13), pp.3103–3111.
- Pfeifer, A. et al., 2000. Suppression of angiogenesis by lentiviral delivery of PEX, a noncatalytic fragment of matrix metalloproteinase 2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(22), pp.12227–32.
- Plonka, P.M. et al., 2009. What are melanocytes really doing all day long...? *Experimental dermatology*, 18(9), pp.799–819.
- Poincloux, R., Lizarraga, F. & Chavrier, P., 2009. Matrix invasion by tumour cells: a focus on MT1-MMP trafficking to invadopodia. *Journal of Cell Science*, 122(17), pp.3015–3024.
- Polato, F. et al., 2005. PRL-3 phosphatase is implicated in ovarian cancer growth. *Clinical Cancer Research*, 11(19 I), pp.6835–6839.
- Ponti, A. et al., 2004. Two distinct actin networks drive the protrusion of migrating cells. *Science (New York, N.Y.)*, 305(5691), pp.1782–6.
- Qu, S. et al., 2014. Independent oncogenic and therapeutic significance of phosphatase PRL-3 in FLT3-ITD-negative acute myeloid leukemia. *Cancer*, 120(14), pp.2130–2141. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24737397> [Accessed May 11, 2017].
- Quesada, V. et al., 2011. Exome sequencing identifies recurrent mutations of the splicing factor SF3B1 gene in chronic lymphocytic leukemia. *Nature genetics*, 44(1), pp.47–52. Available at: <http://www.nature.com/doi/10.1038/ng.1032> [Accessed July 3, 2017].
- Van Raamsdonk, C.D. et al., 2010. Mutations in GNA11 in uveal melanoma. *The New England journal of medicine*, 363(23), pp.2191–9.
- Rabinowits, G. et al., 2009. Exosomal microRNA: a diagnostic marker for lung cancer. *Clinical lung*

- cancer*, 10(1), pp.42–6.
- Radke, I. et al., 2006. Expression and prognostic impact of the protein tyrosine phosphatases PRL-1, PRL-2, and PRL-3 in breast cancer. *British journal of cancer*, 95(3), pp.347–54.
- Rai, K. et al., 2016. Comprehensive review of BAP1 tumor predisposition syndrome with report of two new cases. *Clinical Genetics*, 89(3), pp.285–294.
- Rai, K. et al., 2017. Germline BAP1 alterations in familial uveal melanoma. *Genes Chromosomes and Cancer*, 56(2), pp.168–174.
- Rantala, J.K. et al., 2011. SHARPIN is an endogenous inhibitor of β 1-integrin activation. *Nature cell biology*, 13(11), pp.1315–24.
- Reinhold, D. et al., 2008. MDA-9/syntenin: a positive gatekeeper of melanoma metastasis. *In Vitro*, pp.2356–2363.
- Ren, L. & Khanna, C., 2015. Role of ezrin in osteosarcoma metastasis. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 804, pp.181–201.
- Ren, T. et al., 2009. Prognostic Significance of Phosphatase of Regenerating Liver-3 Expression in Ovarian Cancer. *Pathology & Oncology Research*, 15(4), pp.555–560.
- Rios, P., Li, X. & Köhn, M., 2012. Molecular mechanisms of the PRL phosphatases. *FEBS Journal*, 280, pp.505–524.
- Rodeck, U. et al., 1991. Constitutive expression of multiple growth factor genes by melanoma cells but not normal melanocytes. *The Journal of investigative dermatology*, 97(1), pp.20–6.
- Rolli, M. et al., 2003. Activated integrin α v β 3 cooperates with metalloproteinase MMP-9 in regulating migration of metastatic breast cancer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(16), pp.9482–7.
- Royer-Bertrand, B. et al., 2016. Comprehensive Genetic Landscape of Uveal Melanoma by Whole-Genome Sequencing. *American Journal of Human Genetics*, 99(5), pp.1190–1198.
- Rubio, T. & Köhn, M., 2016. Regulatory mechanisms of phosphatase of regenerating liver (PRL)-3. *Biochemical Society transactions*, 44(5), pp.1305–1312.
- Saha, S. et al., 2001. A phosphatase associated with metastasis of colorectal cancer. *Science (New York, N.Y.)*, 294(5545), pp.1343–6.
- Sakai, T. et al., 1998. Modulation of β 1A integrin functions by tyrosine residues in the β 1 cytoplasmic domain. *The Journal of cell biology*, 141(2), pp.527–38.
- Saladin, K., 2014. Anatomy & Physiology: The Unity of Form and Function. In *Anatomy & Physiology: The Unity of Form and Function*. McGraw-Hill, p. 1248.
- Saltiel, A.R. & Kahn, C.R., 2001. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature*, 414(6865), pp.799–806.
- Sands, M., Kron, M.A. & Brown, R.B., 1985. Pentamidine: A Review. *Clinical Infectious Diseases*, 7(5), pp.625–6344.
- Sanz-Moreno, V. & Marshall, C.J., 2010. The plasticity of cytoskeletal dynamics underlying neoplastic cell migration. *Current Opinion in Cell Biology*, 22(5), pp.690–696.
- Saornil, M.A., 2004. Iris colour and uveal melanoma. *Canadian journal of ophthalmology. Journal canadien d'ophtalmologie*, 39(4), pp.448–52.
- Saraiva, V.S. et al., 2005. Immunohistochemical expression of phospho-Akt in uveal melanoma. *Melanoma research*, 15(4), pp.245–50.
- Scala, S. et al., 2007. CXC chemokine receptor 4 is expressed in uveal malignant melanoma and correlates with the epithelioid-mixed cell type. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 56(10), pp.1589–1595.
- Schlaepfer, D.D. et al., 2000. FAK integrates growth-factor and integrin signals to promote cell migration. *Nature Cell Biology*, 2(5), pp.249–256.
- Schober, M. et al., 2007. Focal adhesion kinase modulates tension signaling to control actin and focal adhesion dynamics. *The Journal of Cell Biology*, 176(5), pp.667–680.

- Scholes, A.G.M. et al., 2003. Monosomy 3 in uveal melanoma: correlation with clinical and histologic predictors of survival. *Investigative ophthalmology & visual science*, 44(3), pp.1008–11.
- Schwartz, M.A., 2001. Integrin signaling revisited. *Trends in cell biology*, 11(12), pp.466–70.
- Seabra, M.C. et al., 1992. Rab geranylgeranyl transferase. A multisubunit enzyme that prenylates GTP-binding proteins terminating in Cys-X-Cys or Cys-Cys. *The Journal of biological chemistry*, 267(20), pp.14497–503.
- Semba, S., Mizuuchi, E. & Yokozaki, H., 2010. Requirement of phosphatase of regenerating liver-3 for the nucleolar localization of nucleolin during the progression of colorectal carcinoma. *Cancer Science*.
- Shah, C.P. et al., 2005. Intermittent and chronic ultraviolet light exposure and uveal melanoma: a meta-analysis. *Ophthalmology*, 112(9), pp.1599–607.
- Shattil, S.J., Kim, C. & Ginsberg, M.H., 2010. The final steps of integrin activation: the end game. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 11(4), pp.288–300.
- Sherwood, D.R., 2006. Cell invasion through basement membranes: an anchor of understanding. *Trends in cell biology*, 16(5), pp.250–6.
- Shibue, T. & Weinberg, R.A., 2009. Integrin β 1-focal adhesion kinase signaling directs the proliferation of metastatic cancer cells disseminated in the lungs. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(25), pp.10290–10295.
- Shields, C.L., Kels, J.G. & Shields, J.A., 2015. Melanoma of the eye: Revealing hidden secrets, one at a time. *Clinics in Dermatology*, 33(2), pp.183–196.
- Shields, J.A., Shields, C.L. & Shields, J.A., 2008. *Intraocular tumors : an atlas and textbook*, Wolters kluwer/Lippincott Williams & Wilkins.
- Si, X. et al., 2001. Interaction of Farnesylated PRL-2, a Protein-tyrosine Phosphatase, with the β -Subunit of Geranylgeranyltransferase II. *Journal of Biological Chemistry*, 276(35), pp.32875–32882.
- Sieg, D.J., Hauck, C.R. & Schlaepfer, D.D., 1999. Required role of focal adhesion kinase (FAK) for integrin-stimulated cell migration. *Journal of Cell Science*, 112(16).
- Silletti, S. et al., 2001. Disruption of matrix metalloproteinase 2 binding to integrin α v β 3 by an organic molecule inhibits angiogenesis and tumor growth in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(1), pp.119–124.
- SINGH, A. et al., 2005. Uveal Melanoma: Epidemiologic Aspects. *Ophthalmology Clinics of North America*, 18(1), pp.75–84.
- Singh, A.D. et al., 1998. Lifetime prevalence of uveal melanoma in white patients with ocular (dermal) melanocytosis. *Ophthalmology*, 105(1), pp.195–8.
- Singh, A.D., Kalyani, P. & Topham, A., 2005. Estimating the risk of malignant transformation of a choroidal nevus. *Ophthalmology*, 112(10), pp.1784–1789.
- Singh, A.D., Turell, M.E. & Topham, A.K., 2011. Uveal Melanoma: Trends in Incidence, Treatment, and Survival. *Ophthalmology*, 118(9), pp.1881–1885.
- Skog, J. et al., 2008. Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers. *Nature cell biology*, 10(12), pp.1470–6.
- Smith, J. et al., 2010. The effect of pentamidine on melanoma. *Anti-cancer drugs*, 21(2), pp.181–5.
- Smith, S.D. et al., 2000. Tietz syndrome (hypopigmentation/deafness) caused by mutation of MITF. *Journal of medical genetics*, 37(6), pp.446–8.
- Song, R. et al., 2009. 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(2), p.e4450.
- Stefanidakis, M. & Koivunen, E., 2006. Cell-surface association between matrix metalloproteinases and integrins: Role of the complexes in leukocyte migration and cancer progression. *Blood*, 108(5), pp.1441–1450.
- Stephens, B. et al., 2008. Small interfering RNA-mediated knockdown of PRL phosphatases results in altered Akt phosphorylation and reduced clonogenicity of pancreatic cancer cells. *Molecular*

- cancer therapeutics*, 7(1), pp.202–10.
- Stephens, B.J. et al., 2005. PRL phosphatases as potential molecular targets in cancer. *Molecular cancer therapeutics*, 4(11), pp.1653–61.
- Sun, J.-P. et al., 2007. Phosphatase activity, trimerization, and the C-terminal polybasic region are all required for PRL1-mediated cell growth and migration. *The Journal of biological chemistry*, 282(39), pp.29043–51.
- Sun, J.P. et al., 2005. Structure and biochemical properties of PRL-1, a phosphatase implicated in cell growth, differentiation, and tumor invasion. *Biochemistry*, 44(36), pp.12009–12021.
- Takada, Y., Ye, X. & Simon, S., 2007. The integrins. *Genome biology*, 8(5), p.215.
- Takano, S. et al., 1996. 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 research. Molecular brain research*, 40(1), pp.105–15.
- Tian, W. et al., 2012. Phosphatase of regenerating liver-3 directly interacts with integrin β 1 and regulates its phosphorylation at tyrosine 783. *BMC biochemistry*, 13(1), p.22.
- Trolet, J. et al., 2009. Genomic profiling and identification of high-risk uveal melanoma by array CGH analysis of primary tumors and liver metastases. *Investigative ophthalmology & visual science*, 50(6), pp.2572–80.
- Tshori, S. et al., 2006. Transcription factor MITF regulates cardiac growth and hypertrophy. *The Journal of clinical investigation*, 116(10), pp.2673–81.
- Tulla, M. et al., 2001. Selective binding of collagen subtypes by integrin alpha 1I, alpha 2I, and alpha 10I domains. *The Journal of biological chemistry*, 276(51), pp.48206–12.
- Valdembri, D. & Serini, G., 2012. Regulation of adhesion site dynamics by integrin traffic. *Current opinion in cell biology*, 24(5), pp.582–91.
- Vallotton, P. et al., 2005. Tracking Retrograde Flow in Keratocytes: News from the Front. *Molecular Biology of the Cell*, 16(3), pp.1223–1231.
- Vandsemb, E.N. et al., 2016. Phosphatase of regenerating liver 3 (PRL-3) is overexpressed in human prostate cancer tissue and promotes growth and migration. *Journal of Translational Medicine*, 14(1), p.71.
- Versluis, M. et al., 2011. ERK activation and monosomy 3 are associated with Src expression in uveal melanoma and may serve as biomarkers for Dasatinib treatment. *Acta Ophthalmologica*, 89(s248), pp.0–0.
- Vicente-Manzanares, M. et al., 2007. Regulation of protrusion, adhesion dynamics, and polarity by myosins IIA and IIB in migrating cells. *The Journal of Cell Biology*, 176(5), pp.573–580.
- Vicente-Manzanares, M., Choi, C.K. & Horwitz, A.R., 2009. Integrins in cell migration--the actin connection. *Journal of Cell Science*, 122(2), pp.199–206.
- Vidal, J.L. et al., 1995. "Melanoma 92". epidemiological study of uveal melanoma in France. *Journal français d'ophtalmologie*, 18(8–9), pp.520–8.
- Virgili, G. et al., 2007. Incidence of Uveal Melanoma in Europe. *Ophthalmology*, 114(12), p.2309–2315.e2.
- Walker, T.M. et al., 2002. Expression of angiogenic factors Cyr61 and tissue factor in uveal melanoma. *Archives of ophthalmology (Chicago, Ill. : 1960)*, 120(12), pp.1719–25.
- Wang, H. et al., 2010. PCBP1 suppresses the translation of metastasis-associated PRL-3 phosphatase. *Cancer cell*, 18(1), pp.52–62.
- Wang, H. et al., 2007. PRL-3 down-regulates PTEN expression and signals through PI3K to promote epithelial-mesenchymal transition. *Cancer Research*, 67(7), pp.2922–2926.
- Wang, J., Kirby, C.E. & Herbst, R., 2002. The tyrosine phosphatase PRL-1 localizes to the endoplasmic reticulum and the mitotic spindle and is required for normal mitosis. *Journal of Biological Chemistry*, 277(48), pp.46659–46668.
- Wang, L. et al., 2009. An Anticancer Effect of Curcumin Mediated by Down-Regulating Phosphatase of

- Regenerating Liver-3 Expression on Highly Metastatic Melanoma Cells. *Molecular Pharmacology*, 76(6), pp.1238–1245.
- Wang, L. et al., 2006. Overexpression of phosphatase of regenerating liver-3 in breast cancer: association with a poor clinical outcome. *Annals of Oncology*, 17(10), pp.1517–1522.
- Wang, M. & Casey, P.J., 2016. Protein prenylation: unique fats make their mark on biology. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 17(2), pp.110–122.
- Wang, P., Ballestrem, C. & Streuli, C.H., 2011. The C terminus of talin links integrins to cell cycle progression. *The Journal of Cell Biology*, 195(3), pp.499–513.
- Wang, Y. et al., 2007. Expression of the human phosphatases of regenerating liver (PRLs) in colonic adenocarcinoma and its correlation with lymph node metastasis. *International journal of colorectal disease*, 22(10), pp.1179–84.
- Wang, Y. & Lazo, J.S., 2012. Metastasis-associated phosphatase PRL-2 regulates tumor cell migration and invasion. *Oncogene*, 31(7), pp.818–827.
- Wang, Y. & McNiven, M.A., 2012. Invasive matrix degradation at focal adhesions occurs via protease recruitment by a FAK–p130Cas complex. *The Journal of Cell Biology*, 196(3).
- Weber, A. et al., 2003. Absence of mutations of the BRAF gene and constitutive activation of extracellular-regulated kinase in malignant melanomas of the uvea. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, 83(12), pp.1771–6.
- Wehrle-Haller, B., 2012. Assembly and disassembly of cell matrix adhesions. *Current opinion in cell biology*, 24(5), pp.569–81.
- Weineberg, R.A., 2014. *The Biology of Cancer, second edition*,
- Wennerberg, K. et al., 1998. Mutational analysis of the potential phosphorylation sites in the cytoplasmic domain of integrin beta1A. Requirement for threonines 788–789 in receptor activation. *Journal of cell science*, 111 (Pt 8, pp.1117–1126).
- Williams, K.C. & Coppolino, M.G., 2011. Phosphorylation of Membrane Type 1-Matrix Metalloproteinase (MT1-MMP) and Its Vesicle-associated Membrane Protein 7 (VAMP7)-dependent Trafficking Facilitate Cell Invasion and Migration. *Journal of Biological Chemistry*, 286(50), pp.43405–43416.
- Winograd-Katz, S.E. et al., 2014. The integrin adhesome: from genes and proteins to human disease. *Nature Reviews: Molecular Cell Biology*, 15(4), pp.273–288.
- Winter-Vann, A.M. & Casey, P.J., 2005. Post-prenylation-processing enzymes as new targets in oncogenesis. *Nature reviews. Cancer*, 5(5), pp.405–12.
- Wolfenson, H., Lavelin, I. & Geiger, B., 2013. Dynamic regulation of the structure and functions of integrin adhesions. *Developmental cell*, 24(5), pp.447–58.
- Xing, C. et al., 2016. Ubiquitin-Specific Protease 4-Mediated Deubiquitination and Stabilization of PRL-3 Is Required for Potentiating Colorectal Oncogenesis. *Cancer research*, 76(1), pp.83–95.
- Xu, J. et al., 2011. VEGF promotes the transcription of the human PRL-3 gene in HUVEC through transcription factor MEF2C. J. V. Schmidt, ed. *PLoS one*, 6(11), p.e27165.
- Xu, Y. et al., 2010. Expression and Prognostic Value of PRL-3 in Human Intrahepatic Cholangiocarcinoma. *Pathology & Oncology Research*, 16(2), pp.169–175.
- Xu, Y. et al., 2010. Filamin A regulates focal adhesion disassembly and suppresses breast cancer cell migration and invasion. *The Journal of experimental medicine*, 207(11), pp.2421–37.
- Yamaguchi, Y. & Hearing, V.J., 2014. Melanocytes and their diseases. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 4(5), p.a017046.
- Yamashita, S. et al., 2007. Down-regulation of the human PRL-3 gene is associated with the metastasis of primary non-small cell lung cancer. *Annals of thoracic and cardiovascular surgery : official journal of the Association of Thoracic and Cardiovascular Surgeons of Asia*, 13(4), pp.236–9.
- Yan, D. et al., 2009. MicroRNA-34a inhibits uveal melanoma cell proliferation and migration through downregulation of c-Met. *Investigative ophthalmology & visual science*, 50(4), pp.1559–65.

- Yarovinsky, T.O. et al., 2000. Expression of the protein tyrosine phosphatase, phosphatase of regenerating liver 1, in the outer segments of primate cone photoreceptors. *Brain research. Molecular brain research*, 77(1), pp.95–103.
- Yasumoto, K. et al., 2006. Role of the CXCL12/CXCR4 axis in peritoneal carcinomatosis of gastric cancer. *Cancer research*, 66(4), pp.2181–7.
- Yavuziyigitoglu, S. et al., 2016. Uveal Melanomas with SF3B1 Mutations: A Distinct Subclass Associated with Late-Onset Metastases. *Ophthalmology*, 123(5), pp.1118–28.
- Yoshida, K. et al., 2011. Frequent pathway mutations of splicing machinery in myelodysplasia. *Nature*, 478(7367), pp.64–9.
- Yu, F.-X. et al., 2014. Mutant Gq/11 Promote Uveal Melanoma Tumorigenesis by Activating YAP. *Cancer Cell*, 25(6), pp.822–830.
- Yu, F.X., Zhao, B. & Guan, K.L., 2015. Hippo Pathway in Organ Size Control, Tissue Homeostasis, and Cancer. *Cell*, 163(4), pp.811–828.
- Yu, H. et al., 2014. Tumor suppressor and deubiquitinase BAP1 promotes DNA double-strand break repair. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(1), pp.285–290.
- Yu, L. et al., 2007. Oxidative stress-induced expression and modulation of Phosphatase of Regenerating Liver-1 (PRL-1) in mammalian retina. *Biochimica et biophysica acta*, 1773(9), pp.1473–82.
- Zaidel-Bar, R. & Geiger, B., 2010. The switchable integrin adhesome. *Journal of cell science*, 123(Pt 9), pp.1385–1388.
- Zeng, Q. et al., 2000. Prenylation-dependent association of protein-tyrosine phosphatases PRL- 1, -2, and -3 with the plasma membrane and the early endosome. *Journal of Biological Chemistry*, 275(28), pp.21444–21452.
- Zeng, Q. et al., 2003. PRL-3 and PRL-1 promote cell migration, invasion, and metastasis. *Cancer research*, 63(11), pp.2716–22.
- Zeng, Q., Hong, W. & Tan, Y.H., 1998. Mouse PRL-2 and PRL-3, two potentially prenylated protein tyrosine phosphatases homologous to PRL-1. *Biochemical and biophysical research communications*, 244(2), pp.421–7.
- Zerbini, L.F. et al., 2008. Computational repositioning and preclinical validation of pentamidine for renal cell cancer. *Mol Cancer Ther*, 144(5), pp.724–732.
- Zhang, D. et al., 2004. Dual regulation of MMP-2 expression by the type 1 insulin-like growth factor receptor: the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt and Raf/ERK pathways transmit opposing signals. *The Journal of biological chemistry*, 279(19), pp.19683–90.
- Zhang, P. et al., 2010. [Expression and its relationship of PRL-3 and RhoC in non-small cell lung cancer]. *Zhongguo fei ai za zhi = Chinese journal of lung cancer*, 13(6), pp.598–601.
- Zhang, X. et al., 2008. Talin depletion reveals independence of initial cell spreading from integrin activation and traction. *Nature cell biology*, 10(9), pp.1062–8.
- Zhao, G. et al., 2008. [Expression of phosphatase of regeneration liver-3 in human colorectal carcinoma and its prognosis value]. *Zhonghua wei chang wai ke za zhi = Chinese journal of gastrointestinal surgery*, 11(5), pp.487–91.
- Zheng, P. et al., 2011. Snail as a key regulator of PRL-3 gene in colorectal cancer. *Cancer Biology & Therapy*, 12(8), pp.742–749.
- Zheng, P. et al., 2010. Stathmin, a new target of PRL-3 identified by proteomic methods, plays a key role in progression and metastasis of colorectal cancer. *Journal of Proteome Research*, 9(10), pp.4897–4905.
- Zhou, G., Bao, Z.Q. & Dixon, J.E., 1995. Components of a new human protein kinase signal transduction pathway. *The Journal of biological chemistry*, 270(21), pp.12665–9.
- Zhou, H. et al., 2003. ¹H, ¹³C and ¹⁵N resonance assignments and secondary structure of the human protein tyrosine phosphatase, PRL-2. *Journal of biomolecular NMR*, 27(4), pp.397–8.
- Zhou, J. et al., 2009. Over-expression of phosphatase of regenerating liver-3 correlates with tumor progression and poor prognosis in nasopharyngeal carcinoma. *International Journal of Cancer*,

124(8), pp.1879–1886.

Zhou, J. et al., 2014. Phosphatase of regenerating liver-3 is regulated by signal transducer and activator of transcription 3 in acute myeloid leukemia. *Experimental Hematology*, 42(12), p.1041–1052.e2.

Zimmerman, L.E. & McLean, I.W., 1980. The natural course of untreated uveal melanomas. *Documenta ophthalmologica. Advances in ophthalmology*, 50(1), pp.75–82.

Zimmerman, M.W. et al., 2014. Protein-tyrosine Phosphatase 4A3 (PTP4A3) Promotes Vascular Endothelial Growth Factor Signaling and Enables Endothelial Cell Motility. *Journal of Biological Chemistry*, 289(9), pp.5904–5913.

Zimmerman, M.W., Homanics, G.E. & Lazo, J.S., 2013. Targeted deletion of the metastasis-associated phosphatase Ptp4a3 (PRL-3) suppresses murine colon cancer. *PloS one*, 8(3), p.e58300.

Zuidervaart, W. et al., 2005. Activation of the MAPK pathway is a common event in uveal melanomas although it rarely occurs through mutation of BRAF or RAS. *British Journal of Cancer*, 92(11), pp.2032–8.

Résumé

Rôle de la phosphatase PRL-3/ PTP4A3 dans le processus métastatique du mélanome uvéal

Le mélanome uvéal (MU) est une tumeur maligne intraoculaire rare qui touche environ 500 français par an. Malgré un traitement efficace de la tumeur primaire, la moitié des patients développent des métastases principalement hépatiques dans les années qui suivent le diagnostic. En dépit des nombreux efforts réalisés, les thérapies systémiques adjuvantes restent peu efficaces sur le MU métastatique. L'identification de gènes pronostiques et/ou causals du développement métastatique pourrait ainsi permettre des avancées considérables dans la compréhension de cette pathologie et le développement de nouvelles thérapies. Notre laboratoire a identifié la surexpression du gène codant la protéine tyrosine phosphatase PRL-3/PTP4A3 comme hautement prédictive du risque métastatique et du devenir des patients atteints de MU. Sa surexpression est également décrite dans de nombreux autres types de cancers humains métastatiques. La surexpression de PRL-3 dans des cellules de MU augmente significativement la migration cellulaire in vitro et l'invasion in vivo de manière dépendante de son activité catalytique, ce qui suggère un rôle direct de PRL-3 dans le processus métastatique du MU. De plus, nous avons montré qu'empêcher l'ancrage membranaire de PRL-3 en utilisant un inhibiteur de farnésylation (FTI-277) abolit la migration induite par PRL-3 dans les cellules de MU, ce qui révèle l'importance de son ancrage membranaire pour la migration cellulaire. Le but de ma thèse a été d'identifier et de caractériser des substrats cellulaires, et plus particulièrement membranaires, de PRL-3 qui seraient impliqués dans le processus métastatique du MU. Mes résultats montrent que la surexpression de PRL-3 dans des cellules de MU, empêchent l'adhérence des cellules au collagène I et la maturation de structures d'adhérence (FAs) en anneaux impliquant l'intégrine $\beta 1$ (Itg $\beta 1$), de manière dépendante de son activité catalytique et de son ancrage membranaire. Nous avons également montré que PRL-3 interagit avec l'Itg $\beta 1$ et la déphosphoryle sur son motif de phosphorylation intracytoplasmique riche en S/T (T788 et T789), dont l'état de phosphorylation est connu pour réguler l'adhérence cellulaire. Ainsi, mes travaux de recherche ont permis d'identifier PRL-3 comme régulateur des structures d'adhérence à la matrice extracellulaire (MEC) au travers de la régulation de l'Itg $\beta 1$ et potentiellement de la kinase FAK. De plus, dans les FAs nous avons observé que PRL-3 régule spécifiquement l'agrégation de l'Itg $\beta 1$ mais pas celle de l'Itg $\beta 3$, ainsi nous émettons l'hypothèse que cette régulation par PRL-3 serait différentielle entre les intégrines et dépendante de la MEC. Dans le MU, la migration accrue des cellules par PRL-3 peut également être expliquée par une accumulation de la métalloprotéase MT1-MMP/MMP14 à la surface des cellules. Cette protéine transmembranaire est responsable de la dégradation de différents substrats de la MEC et peut-être trouvée dans les FAs. Un travail auquel j'ai contribué, a montré que PRL-3 favoriserait l'accumulation de MMP14 à la membrane plasmique par l'accélération de son trafic vésiculaire. Enfin durant la dernière année de ma thèse, nous avons entrepris de tester les effets de la pentamidine, un antiparasitaire aux propriétés anti-cancéreuses, sur l'inhibition de l'activité de PRL-3. In vivo, la pentamidine induirait une inhibition moyenne de la croissance tumorale dans un modèle de xénogreffes murins de MU et de métastases. Les essais in vitro sont encore en cours.

Mots clés : mélanome oculaire, PTP4A3/PRL-3, métastases, adhérence et migration cellulaire, intégrines

