

**UNIVERSITÉ DE LA MEDITERRANÉE**  
**AIX-MARSEILLE II**  
**FACULTÉ DES SCIENCES DE LUMINY**  
163 Avenue de Luminy  
13288 MARSEILLE Cedex 09

**THÈSE**

Pour l'obtention du grade de

**DOCTEUR ès SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE LA MEDITERRANÉE**

*Discipline* : BIOLOGIE DES EUCARYOTES spécialité IMMUNOLOGIE

*Présentée et soutenue publiquement par :*

**Amandine CHAIX**

**Les spécificités de la signalisation oncogénique par rapport  
à la signalisation physiologique : le modèle de KIT,  
un récepteur à activité tyrosine kinase.**

Directeur de thèse :  
**Dr. Paulo De Sepulveda**

JURY

<b>Prof. Philippe Naquet</b>	<b>(Président)</b>
<b>Dr. Isabelle Dusanter-Fourt</b>	<b>(Rapporteur)</b>
<b>Dr. Marie-Alix Poul</b>	<b>(Rapporteur)</b>
<b>Dr. Marcel Deckert</b>	<b>(Examineur)</b>
<b>Dr. Sophie Tartare-Deckert</b>	<b>(Examineur)</b>
<b>Dr. Paulo De Sepulveda</b>	<b>(Directeur de thèse)</b>

Date de soutenance : Jeudi 30 septembre 2010



## Table des matières

Table des abréviations .....	7
<b>Introduction: De la physiologie à la pathologie de la voie de communication SCF/KIT : Aspects moléculaires et fonctionnels ...</b>	<b>10</b>
<b>Préambule</b> .....	10
<b>Introduction générale et Problématique</b> .....	11
<b>Partie 1 : Physiologie de la voie SCF/KIT</b> .....	13
1-A- Leçons issues de l'analyse des souris <i>W</i> et <i>S/</i> .....	13
1-B- Rôle de la voie SCF/KIT durant l'embryogenèse .....	14
1-B-1-Rôle dans l'hématopoïèse embryonnaire.....	15
1-B-2-Autres fonctions embryonnaires.....	16
1-C- Rôle de la voie SCF/KIT durant la vie adulte .....	17
1-C-1-Rôle dans les cellules non hématopoïétiques.....	17
1-C-2-Rôle dans l'hématopoïèse adulte.....	18
1-C-3-Rôle dans la physiologie des mastocytes .....	19
1-C-3-1-La voie KIT/SCF est impliquée dans la survie, la prolifération et la différentiation des mastocytes. ....	19
1-C-3-2-La voie KIT/SCF est impliquée dans les fonctions des mastocytes .....	20
1-D- La voie SCF/KIT : un système de communication spécialisé .....	21
1-E- Discussion .....	23
<b>Partie 2 : KIT, un récepteur à activité tyrosine kinase</b> .....	24
2-A- Le ligand de KIT, le SCF.....	24
2-A-1- Origine des formes solubles et membranaires du SCF.....	24
2-A-2- Distribution tissulaire des deux formes de SCF et régulation.....	26
2-A-3- Fonctions des deux formes de SCF .....	27
2-B- Topologie structurale et fonctionnelle du récepteur KIT.....	27
2-B-1- KIT, un RTK de classe III .....	27
2-B-2- Biosynthèse, Composition et Assemblage du récepteur .....	34
2-B-3- Activation de KIT par le SCF.....	35
<b>Partie 3 : Signalisation intracellulaire activée par la voie SCF/KIT</b> .....	38
3-A- Décodage proximal du signal par les récepteurs .....	39
3-A-1- Conversion initiale et module de transfert.....	39
3-A-1-1- Phosphorylation du récepteur .....	39
3-A-1-2- Recrutement des partenaires de signalisation .....	40
a- Les domaines d'interaction protéine-protéine et la structure modulaire des protéines de signalisation.....	40
b- Assemblage du signalosome sur le récepteur activé.....	44
3-A-2- Amplification et propagation du signal en intracellulaire .....	45
3-A-2-1- Les protéines d'ancrage, un module d'amplification du signal ....	45
3-A-2-2- Rôle des effecteurs enzymatiques .....	47
3-B- Les voies de signalisation intracellulaires activées par KIT .....	50
3-B-1- Méthodes d'étude de la signalisation intracellulaire .....	50
3-B-2- Descriptif des voies activées en aval du signalosome KIT.....	52
3-B-2-1- La voie PI3K/AKT .....	52
a- Généralités sur les PI3K.....	52
b- Signalisation par la Voie PI3K/AKT .....	53
c- KIT et la voie PI3K.....	53
3-B-2-2- La voie PLC $\gamma$ .....	55

a- Généralités sur les PLC.....	55
b- Signalisation par la voie PLC $\gamma$ /Ca <sup>2+</sup> /PKC.....	55
c- KIT et la voie PLC $\gamma$ .....	55
3-B-2-3- Les voies MAPK.....	56
a- Généralités sur les voies MAPK.....	56
b- KIT et les voies MAPK.....	57
3-B-2-4- La voie des SFK.....	58
a- Généralités sur les SFK.....	58
c- KIT et les SFK.....	60
3-B-2-5- La voie JAK/STAT.....	62
a- Généralités sur les JAK.....	62
b- Généralités sur les STATs.....	63
c- KIT et la voie JAK-STAT.....	64
3-C- Les mécanismes d'atténuation et de terminaison de la signalisation intracellulaire.....	66
3-C-1- Généralités sur l'atténuation du signal RTK.....	66
3-C-2- Mécanismes d'atténuation de la signalisation initiée par KIT.....	67
3-C-2-1- Inhibition de l'activité kinase du récepteur.....	67
a- Par les PKC.....	67
b- Par les Tyrosine Phosphatases.....	68
3-C-2-2- Inhibition de l'activité plateforme du récepteur.....	70
a- Par les PTPs.....	70
b- Par les protéines SOCS.....	70
3-C-3- Généralités sur la terminaison des signaux émanant des RTK: endocytose et dégradation des récepteurs.....	71
3-C-3-1- Ubiquitine et ubiquitination.....	72
3-C-3-2- Cbl, une E3-ubiquitine ligase agissant sur les RTK.....	72
3-C-3-3- Endocytose clathrine-dépendante et dégradation des RTK.....	74
3-C-4- Dégradation des RTK par le protéasome?.....	76
3-C-4-Terminaison de la signalisation intracellulaire activée par la voie SCF/KIT.....	77
3-4-1- Notions cinétiques.....	77
3-4-2- Notions mécanistiques.....	77
3-D- Les facteurs déterminants la spécificité de la signalisation intracellulaire activée par les RTK.....	79
3-D-1- La redondance et ses limites.....	80
3-D-1-1- Redondance de l'activation des voies au niveau du récepteur.....	80
3-D-1-2- Redondance transcriptionnelle des voies au niveau génique.....	81
3-D-1-3- Les limites de la redondance : vers la spécificité.....	83
a- De l'étude des modèles cellulaires.....	83
b- De l'étude des modèles animaux.....	84
3-D-1-4- La signalisation : un ballet dans l'espace et le temps.....	85
3-D-2- Amplitude initiale de la signalisation.....	86
Intégration à l'échelle du récepteur.....	86
3-D-2-1- Nature du signal ligand.....	86
3-D-2-2- Encodage de l'intensité du signal ligand au niveau du récepteur.....	87
a- Exemples de réponses dose dépendantes des RTK.....	87
b- Activation, Ubiquitination et Internalisation des RTK.....	89
c- Retour sur les spécificités biologiques des formes solubles et membranaires du SCF.....	92

3-D-3- Cinétique de la signalisation émise par un récepteur .....	93
3-D-3-1- Spécificité catalytique des PTPs .....	94
3-D-3-2- Régulation de l'activité catalytique des PTPs.....	94
a- Oxydation .....	94
b- Phosphorylation.....	94
c- Liaison avec un ligand et dimérisation dans le cas des RPTPs.....	94
d- Recrutement membranaire .....	95
e- Protéolyse.....	95
3-D-3-3- Localisation subcellulaire des PTPs.....	95
3-D-4- Localisation du signalosome d'un récepteur .....	96
3-D-4-1- Enzymologie de la signalisation .....	96
3-D-4-2- Les endosomes, une structure de localisation et d'amplification	
Implications dans la spécificité de la signalisation.....	98
a- Les endosomes et la signalisation intracellulaire.....	98
b- Contribution au codage spatio-temporel de la signalisation .....	99
c- Eléments de discussion .....	101
3-D-5- La signalisation à l'échelle cellulaire .....	101
3-D-5-1- Intégration membranaire .....	102
a- Synergie au niveau des récepteurs .....	102
b- Synergie au niveau des protéines d'ancrage.....	103
c- Contrôle combinatoire et spécificité .....	104
d- Intégration spatiale de plusieurs activations - Importance des radeaux	
lipidiques.....	106
3-D-5-2- Intégration dans les voies .....	111
a- Au niveau protéique.....	111
b- Au niveau transcriptionnel .....	111
3-D-5-3- Importance du contexte cellulaire .....	111
3-D-6- Conclusion .....	112
3-E- Modélisation des réseaux de signalisation et Biologie Systémique .....	116
3-E-1- Analyse systémique de la signalisation intracellulaire.....	117
3-E-2- Ce que nous apprend la modélisation.....	118
3-E-3- Quand le système perd les pédales.....	120
<b>Partie 4 : Pathologie de la voie SCF/KIT, implication dans les néoplasies..</b>	<b>121</b>
4-A- Le cancer, une maladie génétique.....	121
4-B- Oncogènes et gènes suppresseurs de tumeurs dans la fonction de	
prolifération.....	123
4-C- Les mécanismes d'activation oncogéniques des tyrosine kinases .....	125
4-C-1- Modifications quantitatives.....	125
4-C-1-1- Amplification génique .....	126
a- Amplification de KIT.....	126
b- Stimulation autocrine de la voie SCF/KIT dans les tumeurs solides.	126
4-C-1-2- Altération de la régulation au niveau génique .....	127
4-C-2- Modifications qualitatives .....	128
4-C-2-1- Création d'une protéine de fusion par translocations	
chromosomiques.....	128
4-C-2-2- Mutations affectant les mécanismes d'autocontrôle de l'activité	
kinase.....	129
a- Mutations affectant la dimérisation .....	130
b- Mutations affectant l'autorégulation conformationnelle du récepteur	132
c- Mutations affectant l'activité kinase du récepteur .....	134

4-C-2-3- Mutations affectant les systèmes de régulation négative de l'activité des kinases.....	136
<b>Partie 5 : Signalisation oncogénique par les RTK activés</b> .....	137
5-A- Les modifications quantitatives de la signalisation.....	138
5-A-1- Modification de la durée de vie de l'activation.....	138
5-A-1-1- Echappement aux phosphatases.....	138
5-A-1-2- Echappement aux mécanismes d'endocytose et de dégradation.....	139
a- A propos des oncogènes viraux .....	139
b- Le cas des protéines de fusion .....	140
5-A-2- Modification du seuil d'activation.....	141
5-A-2-1- Activation et pouvoir transformant des RTK : mise en évidence d'un effet dose .....	141
5-A-2-2- Implications dans la transformation cellulaire.....	142
5-B- Les modifications qualitatives de la signalisation.....	143
5-B-1- Modification des propriétés catalytiques de l'enzyme .....	143
5-B-1-1- Généralités sur la spécificité catalytique des PTK.....	143
5-B-1-2- Spécificité catalytique des RTK oncogéniques.....	144
a- Au niveau du récepteur lui-même.....	144
b- Au niveau des substrats (en aval) .....	147
5-B-2- Modification de la localisation .....	148
5-B-2-1- Généralités sur la maturation des glycoprotéines membranaires.....	148
5-B-2-2- Maturation normale des RTK .....	149
5-B-2-3- Maturation défectueuse des RTK activés.....	150
5-B-2-4- Parenthèse sur le lien entre la phosphorylation et la maturation des RTK sauvages.....	152
5-B-2-5- Défaut de maturation des RTK activés: conséquences en terme de signalisation.....	153
a- À propos de la contribution oncogénique de la signalisation intracellulaire.....	153
b- À propos des différences entre les signalisations normales et oncogéniques .....	154
5-C- Conclusion générale.....	157
<b>Travaux expérimentaux : Etude moléculaire et fonctionnelle de la signalisation oncogénique de KIT<sup>D816V</sup></b> .....	162
<b>Partie 1 : Mécanismes de l'activation des STATs par KIT<sup>D816V</sup> et implication dans la transformation mastocytaire.</b> .....	162
1-A- Introduction.....	163
1-A-1- Physiologie des protéines STATs (Signal Transducers and Activators of Transcription).....	163
1-A-1-1- Gènes et protéines.....	163
1-A-1-2- La voie JAK/STAT : le paradigme initial .....	164
1-A-1-3- Vers un nouveau modèle ? .....	165
a- À propos des voies conduisant à l'activation des STATs .....	165
b- A propos des monomères de STATs.....	166
c- A propos du transport nucléo-cytoplasmique des STATs .....	167
d- A propos des modifications post-traductionnelles des STATs.....	167
e- À propos des fonctions non conventionnelles et non transcriptionnelles des STATs.....	169
1-A-1-4- Les régulations négatives du signal STAT .....	169
1-A-1-5- Les fonctions biologiques des STATs .....	169

a- Les cibles et fonctions transcriptionnelles des STATs.....	170
b- Les fonctions non conventionnelles et non transcriptionnelles des STATs.....	171
1-A-2- STATs et cancers .....	172
1-B- Résultats expérimentaux .....	177
1-B-1- Les mécanismes d'activation des STATs : Etude biochimique .....	177
1-B-2- Implication des STATs dans la transformation cellulaire : Etude fonctionnelle.....	177
1-B-2-1- De l'utilisation des SiRNA.....	178
a- À propos du taux d'extinction.....	178
b- À propos de l'effet off-target des SiRNA .....	179
c- À propos des tests de prolifération .....	179
1-B-2-2- De l'utilisation des ShRNA .....	180
1-C- Les questions en suspend... Perspectives de ce travail.....	180
1-D- Manuscrit: « Mechanisms of STAT protein activation by oncogenic KIT mutants in neoplastic mast cells » .....	181
<b>Partie 2 : Fonction des tyrosines Y568 et Y570 dans la transformation cellulaire dépendante de KIT<sup>D816V</sup></b> .....	182
2-A- Introduction.....	182
2-A-1- Le motif dityrosine du domaine juxtamembranaire des RTK de classe III .....	182
2-A-2- Le motif dityrosine juxtamembranaire de KIT .....	183
2-A-2-1- Considérations biochimiques .....	183
2-A-2-2- Les interacteurs connus du motif dityrosine .....	183
2-A-2-3- Les fonctions connues du motif dityrosine dans le contexte du récepteur KIT sauvage .....	186
a- Etude des souris transgéniques knocked-in .....	186
b- Etude <i>in vitro</i> de mutants « add-back » F->Y .....	188
c- Etude <i>in vitro</i> de mutants ponctuels Y->F .....	189
d- Conclusions .....	190
2-A-2-4- Les fonctions connus du motif dityrosine dans le contexte du récepteur KIT activé/oncogénique.....	190
2-A-3- Objet de ce travail expérimental.....	191
2-B- Résultats des travaux .....	192
2-B-1- Caractérisation des Interactions sur la plateforme Y568-Y570 .....	192
2-B-2- Rôle de la plateforme Y568-Y570 dans la transformation cellulaire induite par KIT-D816V .....	196
2-B-3- Rôle de la plateforme Y568-Y570 dans la migration cellulaire induite par KIT-D816V .....	200
2-B-4- Modifications moléculaires suite à la perte de la plateforme Y568-Y570 .....	205
2-B-5- Différentes localisations subcellulaires des formes activées de KIT .	210
2-C- Discussion .....	212
2-C-1- Résumé .....	212
2-C-2- Discussion de nos résultats .....	212
2-C-2-1- Les interacteurs de la plateforme.....	212
a- Détail des partenaires d'interaction .....	212
b- Analyse globale des interactions .....	213
c- Contexte de l'interaction .....	214
d- A propos des absentes... les SFK.....	214

e- Interaction dans le contexte des protéines endogènes.....	215
f- Analyse des interactions dans les cellules Ba/F3.....	215
2-C-2-2- Localisation subcellulaire différentielle des récepteurs mutants.	215
2-C-2-3- Fonction de la plateforme sous KIT activé .....	216
a- Dans les cellules en culture .....	216
b- Dans les souris nude .....	217
2-C-3- Conclusion générale et Discussion.....	218
2-D- Matériel et Méthodes .....	222
<b>Conclusion générale et discussion : Les RTK oncogéniques, des</b>	
<b>cibles thérapeutiques ? .....</b>	<b>228</b>
Références bibliographiques .....	238

## Table des abréviations

*Pour éviter un usage mixte des abréviations anglaises/françaises, l'abréviation anglaise a été systématiquement utilisée dans ce manuscrit. Elles sont définies dans cette table.*

### Abréviations générales

<b>AML:</b>	Acute Myeloid Leukemia	<b>miRNA:</b>	micro RNA
<b>ATP:</b>	Adenosine TriPhosphate	<b>NCD:</b>	Non Clathrin-Dependant endocytosis
<b>BFA:</b>	Brefeldin A	<b>N(E/L)S:</b>	Nuclear Export/Location Signal
<b>BMDC:</b>	Bone Marrow Derived Mast Cells	<b>NK:</b>	Natural Killer cells
<b>CBF:</b>	Core Binding Factor	<b>p :</b>	peptide
<b>CFU:</b>	Colony-Forming Unit	<b>PAGE:</b>	PolyAcrylamide Gel Electrophoresis
<b>CLL:</b>	Chronic Lymphocytic Leukemia	<b>PGC:</b>	Primordial Germ Cells
<b>CME:</b>	Clathrin-Mediated Endocytosis	<b>PH:</b>	Pleckstrin Homology domain
<b>CML:</b>	Chronic Myeloid Leukemia	<b>PIP2:</b>	Phosphatidylinositol 4,5-biPhosphate
<b>CMML:</b>	Chronic MyeloMonocytic Leukemia	<b>PIP3:</b>	Phosphatidylinosito 3,4,5-triPhosphate
<b>CNS:</b>	Central Nervous System	<b>PTB:</b>	PhosphoTyrosine-Binding
<b>DAG:</b>	Di-Acyl Glycerol	<b>PTK:</b>	Protein Tyrosine Kinase
<b>DNA:</b>	DeoxyriboNucleic Acid	<b>PTP:</b>	Protein Tyrosine Phosphatase
<b>ECD:</b>	ExtraCellular Domain	<b>R:</b>	Receptor
<b>eHSC:</b>	embryonic Haematopoietic Stem Cells	<b>RME:</b>	Raft-Mediated Endocytosis
<b>ER:</b>	Endoplasmic Reticulum	<b>RNA:</b>	RiboNucleic Acid
<b>GOF:</b>	Gain Of Function	<b>RTK:</b>	Receptor Tyrosine Kinase
<b>GPI:</b>	Glycosyl-PhosphatidilInositol	<b>SCF:</b>	Stem Cell Factor
<b>IEG:</b>	Immediate Early Genes	<b>SH:</b>	SRC homology
<b>ICC:</b>	intestinal Interstitial Cells of Cajal	<b>ShRNA:</b>	Short hairpin RNA
<b>IP3:</b>	Inositol Tri-Phosphate	<b>SiRNA:</b>	Small interfering RNA
<b>JM:</b>	JuxtaMembrane (Domain)	<b>SI :</b>	Steel
<b>KD:</b>	Kinase Domain	<b>SI<sup>d</sup> :</b>	Steel dickie
<b>KI :</b>	Knocked-In (mice)	<b>TKB:</b>	Tyrosine-Kinase-Binding
<b>Lo:</b>	Liquid-ordered	<b>TKI:</b>	Tyrosine Kinase Inhibitors
<b>Ld:</b>	Liquid-disordered		

**TPA:** 12-O-TetradecanoylPhorbol-13-Acetate

**W:** White spotting

**WT:** Wild Type

## **Abréviations des protéines de signalisation**

**CBL:** Casitas B Lymphoma

**CSK:** C-terminal SRC Kinase

**EGF:** Epidermal Growth Factor

**EGFR:** Epidermal Growth Factor Receptor

**EPO:** ErythroPOietin

**EPOR:** ErythroPOietin Receptor

**ERK:** Extracellular signal Regulated Kinase

**FAK:** Focal Adhesion Kinase

**GAB2:** GRB-Associated Binder 2

**GAP:** GTPase Activating proteins

**GCPR:** G-Coupled Protein Receptor

**GDI:** Guanosine nucleotide Dissociation Inhibitors

**GEF:** Guanine nucleotide Exchange Factors

**GRB2:** Growth factor Receptor-Bound protein 2

**HDAC:** Histone DeACetylase

**IFN:** InterFeroN

**IL:** InterLeukin

**ITAM:** Immuno Tyrosine-based Activation Motif

**JAK:** JAnus Kinase

**JNK:** JuN amino-terminal Kinase

**LAT:** Linker for Activation of T cells

**MAPK:** Mitogen-Activated Protein Kinase

**PDK1:** Phosphoinositide-Dependent protein Kinase

**PI3K:** Phosphatidylinositol 3-Kinase

**PKB:** Protein Kinase B

**PKC:** Protein Kinase C

**PKD:** Protein Kinase D

**PLC:** PhosphoLipase C

**RAS:** Roux Avian Sarcoma

**RAC:** RAs- related C3 botulinum toxin substrate

**RHO:** RAS HOmologous member

**SFK:** SRC Family Kinases

**SHC:** SH2 domain-Containing transforming protein

**SHIP:** SH2-containing Inositol Phosphate

**SHP:** SH2-containing Phosphatase

**SOCS:** Suppressor Of Cytokine Signaling

**SOS:** Son Of Sevenless

**STAT:** Signal Transducer and Activator of Transcription

**TGF:** Transforming Growth factor

**TLR:** Toll-Like Receptor

**mTOR:** mammalian Tagret Of rapamycin

**STS:** Suppressor of T cell Signaling

**SYK:** Spleen Tyrosine Kinase

**Wnt:** Wingless iNTEgration site

## Introduction

De la physiologie à la pathologie  
de la voie de communication SCF/KIT :  
Aspects moléculaires et fonctionnels.

## Introduction: De la physiologie à la pathologie de la voie de communication SCF/KIT : Aspects moléculaires et fonctionnels.

### **Préambule**

Au cours de l'évolution, le passage de l'état unicellulaire à l'état pluricellulaire s'accompagne dans tous les règnes de trois adaptations nécessaires : la différenciation cellulaire, le développement de systèmes d'adhésion et de systèmes de communication intercellulaires. Quel que soit le règne considéré, la comparaison deux à deux d'un unicellulaire et d'un homologue pluricellulaire proche révèle une augmentation du nombre de gènes impliqués dans ces trois propriétés <sup>1</sup>. Ainsi les cellules peuvent se partager les différentes fonctions vitales en se spécialisant dans l'une ou l'autre des fonctions - c'est la différenciation - le tout en assurant la coordination fonctionnelle de l'ensemble par des systèmes de cohésion et de communications cellulaires.

On désigne par signalisation l'ensemble des mécanismes assurant les communications intercellulaires. Chez les métazoaires, il existe au moins dix-sept voies de signalisation intercellulaires différenciables par leurs intermédiaires de transduction. Certaines comme les voies Wnt, TGF-beta, Hedgehog sont majoritaires au cours du développement embryonnaire, d'autres sont utilisées plus tard dans le fonctionnement des cellules différenciées. La voie des récepteurs à activité tyrosine kinase (RTK) est utilisée à la fois au cours du développement embryonnaire et durant la vie adulte <sup>2</sup>.

Les voies de signalisation des RTK sont des voies à médiation humorale qui font intervenir des médiateurs chimiques solubles appelés facteurs de croissance. Les RTK sont des récepteurs cellulaires de haute affinité pour ces facteurs, capables d'analyser l'information et de la convertir en une réponse biologique adaptée.

La voie du facteur de croissance Stem Cell Factor (SCF) associé à son récepteur KIT est l'une d'entre elles. C'est une voie de communication intercellulaire de proximité qui est essentielle au développement et à la fonction de plusieurs lignages cellulaires au cours du développement embryonnaire et à l'âge adulte. Des anomalies dans l'expression ou la fonction de KIT ou dans celle de son ligand le SCF sont associées à différentes pathologies humaines ciblant les compartiments

cellulaires dans lesquels la voie SCF/KIT joue un rôle physiologique. Certaines pathologies assez rares sont liées à une diminution de la fonction globale de la voie (on parle de perte de fonction) et d'autres plus nombreuses apparaissent suite à une hyper activation de la voie (on parle de gain de fonction). Ces dernières pathologies incluent des néoplasies bénignes ou malignes, c'est-à-dire des cancers.

## **Introduction générale et Problématique**

Le système de communication SCF/KIT est un système hautement spécialisé. Les informations transmises par le SCF sont analysées par les cellules qui expriment KIT au cours d'un processus de traitement du signal appelé signalisation intracellulaire. Cette signalisation conduit à des modifications cellulaires transcriptionnelles et non transcriptionnelles permettant à la cellule d'avoir une réponse biologique adaptée à son environnement. La signalisation intracellulaire est un processus complexe et hautement régulé.

Dans certaines conditions pathologiques, le système s'emballé. Les cellules sont alors déconnectées de leur environnement et peuvent se transformer en cellules cancéreuses. Cette transformation cellulaire a par exemple lieu suite à l'activation oncogénique de KIT par des mutations dites gain de fonction (GOF) qui isolent le récepteur des mécanismes de régulation physiologique normalement responsables de sa mise au repos.

L'objectif des travaux expérimentaux de cette thèse est d'étudier certains mécanismes moléculaires de la signalisation oncogénique de formes constitutivement activées du récepteur KIT et leur implication dans la transformation cellulaire. Cette étude est menée d'une part au niveau proximal sur le récepteur lui-même et d'autre part au niveau distal sur l'une des voies de signalisation intracellulaire activées en aval du récepteur.

Nous pensons que la spécificité de la signalisation oncogénique ne peut être appréhendée que par la compréhension des mécanismes assurant l'efficacité de la signalisation intracellulaire dans les conditions physiologiques.

C'est pourquoi, dans l'introduction de ce manuscrit de thèse, nous évoquons d'abord les données connues sur le rôle physiologique de la voie SCF/KIT et sur les mécanismes moléculaires permettant de rendre compte de la spécificité de la signalisation dans les conditions normales.

Dans une deuxième temps nous présentons les conséquences de l'activation pathologique de la voie d'abord à l'échelle de l'organisme, en évoquant les différentes pathologies, en particulier cancéreuses, liées aux dérégulations de la voie SCF/KIT puis à l'échelle cellulaire en abordant la description et la mécanistique de la signalisation intracellulaire oncogénique.

Enfin, si dans la majorité des cas l'introduction de ce manuscrit est illustrée à l'aide d'exemples concernant la voie SCF/KIT, les concepts généraux et certaines hypothèses de travail sont éclairées par des données issues de l'étude d'autres membres de la famille des RTK.

## Partie 1 : Physiologie de la voie SCF/KIT

Les êtres vivants pluricellulaires coordonnent et régulent leurs activités à chaque niveau de leur organisation grâce à des systèmes complexes de communication intercellulaires.

La voie SCF/KIT constitue un des systèmes de communication intercellulaire. Le SCF est un facteur de croissance qui agit sur des cellules cibles qui expriment son récepteur KIT. La voie SCF/KIT est impliquée dans le développement et la fonction de plusieurs lignages cellulaires au cours du développement embryonnaire mais aussi durant la vie adulte. Ce chapitre est consacré à la description des fonctions physiologiques du couple SCF/KIT.

### 1-A- Leçons issues de l'analyse des souris *W* et *Sl*

Le gène *c-kit*, qui code pour un récepteur à activité tyrosine kinase, fut découvert en 1987<sup>3</sup> comme la contrepartie cellulaire de l'oncogène viral *v-kit* présent dans le virus HZ4-FeSV (Hardy-Zuckerman 4 Feline Sarcoma Virus) impliqué dans des fibrosarcomes chez le chat<sup>4</sup>. Un an après il fut établi que *c-kit* était allélique au locus murin White spotting (*W*)<sup>5,6</sup>. Le ligand de KIT fut identifié en 1990<sup>7</sup>, révélant qu'il était allélique du locus murin Steel (*Sl*)<sup>8</sup>.

Chez la souris, il existe de nombreuses mutations naturelles qui affectent les locus *Sl* (Steel) et *W* (White spotting), codant respectivement pour le SCF et KIT<sup>9</sup>. La caractérisation moléculaire de ces mutations (revue dans<sup>10</sup>) a permis de mettre en évidence que la sévérité du phénotype *W* corrèle avec le niveau de perte d'activité kinase de KIT<sup>11</sup>.

La voie SCF/KIT est une des rares pour laquelle la relevance physiologique a pu être appréhendée précocement de part l'existence des souris *Sl* et *W*. Aujourd'hui, pour répondre à ces questions, les techniques de biologie moléculaire modernes permettent le développement ciblé de souris transgéniques. La diversité naturelle des mutants *W* et *Sl* avec son spectre d'altérations associées reste à cet égard un formidable outil d'étude à l'échelle de l'organisme (identification des

problèmes développementaux des animaux) mais aussi à l'échelle moléculaire (relation structure-fonction de KIT et du SCF) <sup>12</sup>.

Ainsi, les souris *Sl* et *W* ont révélé le rôle fondamental du couple SCF/KIT dans la physiologie des cellules germinales primordiales, des cellules hématopoïétiques -et en particulier des mastocytes-, des cellules interstitielles intestinales de Cajal (ICCs), et des mélanocytes.

La perte d'expression totale des protéines KIT ou SCF conduit à la mort in utero ou dans la période périnatale pour cause d'anémie macrocytique sévère. Dans le cas de mutations moins « fortes » (hypomorphes), se traduisant soit par une diminution de la production de SCF soit par une baisse de l'activité kinase de KIT, on voit apparaître, en plus de l'anémie, un spectre d'altérations phénotypiques: une diminution de la fertilité, un défaut de pigmentation, une diminution du nombre de mastocytes tissulaires, un défaut d'activité pacemaker intestinale. De plus, pour certaines de ces mutations, la pénétrance dépend du tissu et du stade de développement.

*Pour un article de revue décrivant les différents mutants et les phénotypes des souris correspondants, consulter la référence <sup>13</sup>.*

## **1-B- Rôle de la voie SCF/KIT durant l'embryogenèse**

Au cours de l'embryogenèse, les ARN messagers de KIT et du SCF sont exprimés sur les trajectoires de migration et de destination des cellules germinales primordiales et des mélanocytes, mais aussi dans les lieux d'hématopoïèse embryonnaire et enfin dans l'intestin et le système nerveux central <sup>14 15 16</sup>. Ces données suggèrent que la voie SCF/KIT est impliquée dans l'hématopoïèse embryonnaire et le développement du système nerveux et qu'elle influence la migration des cellules primordiales vers leur destination finale, appelée niche.

## 1-B-1-Rôle dans l'hématopoïèse embryonnaire

Avant même d'avoir identifié les gènes impliqués, des expériences de transplantation croisées de cellules de moelle ou de tissu splénique dans des animaux *W* ou *Sl*, avaient mis en évidence que le défaut *W* était un défaut intrinsèque au compartiment hématopoïétique alors que le défaut *Sl* affectait le microenvironnement (voir par exemple <sup>17</sup>).

La moelle osseuse des souris *W/W'* et *Sl/Sl<sup>d</sup>* contient moins de colonies progénitrices précoces (CFU-S: Colony-Forming Units-Splen) et moins de colonies progénitrices engagées dans les lignages érythroïdes (CFU-E : Colony-Forming Units-Erythroid) et granuleux/macrophages (CFU-GM : Colony-Forming Units-Granulocytes-Macrophages) <sup>18</sup>.

Les souris *W* et *Sl* meurent *in utero* des conséquences d'une anémie sévère. La voie SCF/KIT agit en coordination avec la voie Epo/EpoR au cours de l'érythropoïèse définitive embryonnaire et adulte <sup>19 20</sup>. Elles ont donc un rôle majeur dans la régulation de l'érythropoïèse et cet aspect sera abordé au [paragraphe 3-D-5-1-a](#).

Le rôle du couple SCF/KIT dans l'hématopoïèse est un sujet vaste qui ne sera pas développé dans ce manuscrit. Nous présentons ici succinctement l'un de ses aspects qui concerne le rôle de la voie KIT/SCF dans le **maintien des cellules souches hématopoïétiques embryonnaires (eHSC)**.

*In vivo*, les progéniteurs hématopoïétiques du foie fœtal expriment KIT bien qu'ils ne soient dépendants de son activation qu'à certains stades de développement <sup>21</sup>. Cette activation semble avoir un rôle majeur dans la capacité des cellules souches hématopoïétiques (HSCs) à reconstituer l'hématopoïèse à long terme <sup>22</sup>. *In vitro* il a été montré que les divisions symétriques des HSCs fœtales (qui permettent le maintien du potentiel souche) sont dépendantes de la stimulation de KIT <sup>23</sup>.

Ainsi il semble que la voie SCF/KIT est impliquée dans la croissance et le maintien du compartiment souche des progéniteurs hématopoïétiques dans le foie fœtal,

expliquant le nombre réduit de progéniteurs hématopoïétiques dans les souris déficientes.

## **1-B-2-Autres fonctions embryonnaires**

Les cellules embryonnaires non hématopoïétiques dépendantes de KIT sont les cellules germinales primordiales (PGCs), les mélanoblastes (précurseurs des mélanocytes), et des précurseurs mésenchymateux à l'origine des cellules interstitielles de Cajal (ICCs) <sup>24</sup>.

Sans détailler, les données disponibles font apparaître que, pour chaque population concernée, le rôle de l'activation de la voie SCF/KIT est complexe et les conséquences fonctionnelles peuvent varier au cours de la différenciation.

Par exemple, les **mélanocytes primordiaux** (appelés mélanoblastes) sont dépendants de la voie SCF/KIT pour leur survie (et n'entraîne pas leur différenciation) <sup>25</sup> puis plus tard, pour leur prolifération <sup>26</sup>. La voie influence aussi leur migration ; durant le développement embryonnaire au cours la migration des mélanoblastes de la crête neurale vers le derme naissant mais aussi en période néo-natale durant leur translocation du derme vers l'épiderme <sup>27 28</sup>.

De la même manière pour les **PGCs**, la prolifération et la migration KIT-dépendante sont deux phénomènes intrinsèquement.

*Pour un article de revue sur le sujet, consulter la référence <sup>29</sup>.*

Enfin, concernant les **ICCs**, le rôle de la voie SCF/KIT dépend du stade de développement. Elle est d'abord impliquée dans la migration des précurseurs, et, ensuite, elle est essentiellement requise pour une phase de prolifération néo-natale. La perte de l'expression de KIT corrèle avec la différenciation des précurseurs communs en cellules musculaires lisses alors que les futures ICCs maintiennent l'expression de KIT, suggérant que la voie KIT/SCF joue un rôle (par défaut ou non) dans la différenciation des ICCs matures <sup>30</sup>.

## 1-C- Rôle de la voie SCF/KIT durant la vie adulte

Durant la vie adulte, l'expression de KIT et du SCF est maintenue dans le compartiment hématopoïétique. Les cellules différenciées qui continuent à exprimer KIT sont les ICCs, les mélanocytes et les mastocytes et certaines cellules endothéliales. D'autres cellules du système nerveux central (CNS) expriment aussi KIT mais les fonctions de la voie SCF/KIT dans le CNS ne sont étudiées que depuis très récemment et ne seront pas détaillées ici. Enfin certaines cellules souches adultes expriment KIT, telles que les cellules souches cardiaque<sup>31 32</sup>.

### 1-C-1-Rôle dans les cellules non hématopoïétiques

Les **ICCs** sont des cellules pacemakers localisées dans la paroi intestinale. Elles sont responsables de la génération et de la propagation d'ondes péristaltiques lentes le long de l'intestin. Il a été découvert récemment que ces cellules expriment KIT<sup>33</sup> et cette découverte a permis la caractérisation phénotypique et fonctionnelle de ces cellules méconnues jusqu'alors. On sait maintenant que ces cellules forment un réseau dont la maintenance et la fonctionnalité dépendent de l'activité du récepteur KIT<sup>30</sup>.

Le couple SCF/KIT est impliqué dans la prolifération cutanée des **mélanocytes** dans la période post-natale<sup>34</sup> ainsi que dans la survie et la prolifération des mélanocytes à l'âge adulte<sup>35</sup>. Il intervient aussi dans la fonction des mélanocytes, stimulant la pigmentation induite par les UV<sup>36 37</sup> et permettant la régénération cyclique des unités pigmentaires pileuses<sup>38</sup>.

Chez l'adulte, les **cellules interstitielles de Leydig** testiculaires expriment KIT<sup>39</sup> ainsi que les spermatogonies stade A1 à A4<sup>40</sup>. Le SCF est exprimé par les cellules de Sertoli<sup>41</sup>. Il existe des modulations importantes de l'expression du SCF au cours de la maturation des spermatogonies<sup>42</sup>.

*Pour un article de revue sur le rôle de la voie SCF/KIT dans la spermatogenèse, consulter la référence<sup>43</sup>.*

Ainsi, bien que les fonctions et les mécanismes d'action de la voie SCF/KIT dans les mélanocytes, les ICCs et les cellules germinales adultes soient peu connus, il semble que le couple SCF/KIT soit impliqué dans le contrôle de l'homéostasie de chacun de ces types cellulaires à l'âge adulte.

### 1-C-2-Rôle dans l'hématopoïèse adulte

L'activité de KIT est requise *in vivo* pour l'hématopoïèse adulte <sup>44</sup>.

De même que pour les HSCs fœtales, *in vitro*, les divisions symétriques des HSCs sont dépendantes de la stimulation de KIT <sup>45 23</sup> et *in vivo* il assure la survie des HSCs <sup>46</sup>.

Ainsi, le couple SCF/KIT a un rôle majeur dans l'homéostasie des HSCs dans les niches de la moelle osseuse (revue dans <sup>47</sup>).

Le SCF, tout comme de nombreuses autres cytokines, est sécrété par les cellules stromales et pourrait intervenir dans d'autres fonctions que la survie des HSCs <sup>48</sup> telles que la rétention et la recirculation.

Dans les niches, les HSCs adhèrent à la matrice extracellulaire et aux cellules stromales. Le SCF stimule l'adhésion sur fibronectine <sup>49</sup> et pourrait donc jouer un rôle dans la rétention au niveau des niches.

Un faible pourcentage de HSCs circule dans le sang selon un rythme circadien <sup>50</sup>. Le gradient de SCF (ainsi que celui d'autres cytokines) pourrait donc être impliqué par ailleurs dans le retour des HSCs dans la niche <sup>51</sup>.

La voie SCF/KIT joue aussi un rôle fondamental dans l'érythropoïèse adulte. En association avec le récepteur à l'Epo (de manière complémentaire et non redondante), le couple SCF/KIT est requis dans l'érythropoïèse normale ainsi que dans la reconstitution du compartiment érythroïde après une anémie.

*Pour un article de revue sur les rôles de KIT et EpoR dans l'érythropoïèse, consulter par exemple la référence <sup>19</sup>.*

Il est à noter que, très récemment, il a été suggéré que la voie SCF/KIT puisse influencer la réponse immunitaire adaptative par son action sur les cellules dendritiques <sup>52</sup>.

### 1-C-3-Rôle dans la physiologie des mastocytes

Le rôle fondamental de la voie SCF/KIT dans la biologie des mastocytes a été découvert précocement grâce à l'étude des souris *W* et *Sl*. En effet ces souris ne possèdent peu ou pas de mastocytes<sup>53 54</sup>.

Les mastocytes sont des cellules effectrices de l'immunité innée. Les mastocytes matures se situent essentiellement dans les tissus conjonctifs et sont des sentinelles vis-à-vis des pathogènes provenant du milieu extérieur. Ce sont des cellules granuleuses, dont les vésicules contiennent des médiateurs chimiques pro-inflammatoires comme des amines biogènes (sérotonine, histamine, héparine) ou des endopeptidases (tryptase, chymase). L'activation des mastocytes provoque la dégranulation, c'est-à-dire la libération par exocytose du contenu des granules, conduisant à l'initiation de la réponse inflammatoire et facilitant le recrutement des cellules de l'immunité adaptative. D'autre part les mastocytes sont capables de phagocyter certains pathogènes.

L'activation des mastocytes peut être initiée par les récepteurs Toll-Like (TLR) mais surtout par les récepteurs aux fragments Fc des anticorps tels que les FCεRI, des récepteurs de haute affinité pour les IgE. Les IgE sont produites en grande quantité durant une réponse allergique et l'activation des mastocytes qui en découle est responsable des réactions d'hypersensibilité immédiate voire d'une inflammation chronique. Les mastocytes seraient impliqués dans le développement de l'asthme et de l'arthrite rhumatoïde. Par ailleurs il existe une pathologie liée à une hyperprolifération bénigne des mastocytes appelée mastocytose. Les mastocytes représentent donc des cibles thérapeutiques majeures en pathologie humaine.

*Pour un article de revue sur le rôle des mastocytes dans la réponse inflammatoire, consulter la référence<sup>55</sup> et pour les implications pathologiques les références<sup>56 57</sup>.*

#### 1-C-3-1-La voie KIT/SCF est impliquée dans la survie, la prolifération et la différenciation des mastocytes.

Chez la souris, le SCF est un facteur de survie pour les mastocytes, il a un effet anti-apoptotique *in vitro*<sup>58</sup> et *in vivo*<sup>59</sup>. Chez l'homme, il agit en synergie avec

d'autres cytokines comme le NGF<sup>60</sup> ou l'IL-3<sup>61</sup> pour promouvoir la survie des mastocytes matures.

Chez l'homme, la présence de SCF seul est suffisante pour induire la différenciation des progéniteurs hématopoïétiques en mastocytes.

Les cellules mononuclées de la moelle osseuse ou du sang périphérique se différencient en mastocytes matures en présence de SCF<sup>62</sup>.

Lorsqu'elles sont cultivées en présence de SCF, les cellules CD34+ humaines de moelle osseuse<sup>63</sup> et de sang de cordon<sup>64 65</sup> ou les cellules de foie fœtal<sup>66</sup> se différencient en mastocytes matures.

D'autres cytokines telle que l'IL3 sont requises pour le développement et la maturation des mastocytes de souris<sup>67</sup>.

### 1-C-3-2-La voie KIT/SCF est impliquée dans les fonctions des mastocytes

Le SCF est un **chimio-attractant** capable de faire migrer les mastocytes murins et humains *in vitro*<sup>68 69</sup> mais aussi vraisemblablement *in vivo*. Ceci est par exemple suggéré par des expériences montrant que le liquide broncho-alvéolaire de patients asthmatiques possède une activité chemo-attractive sur les mastocytes qui est bloquée par un anticorps anti-SCF<sup>70</sup>.

Le SCF augmente l'**adhésion** des mastocytes murins à la fibronectine de manière intégrine-dépendante, et ceci requiert l'activité kinase de KIT<sup>71</sup>. L'adhésion des mastocytes humains est favorisée par le SCF en combinaison avec d'autres cytokines<sup>72</sup> et est inhibée par l'imatinib, un inhibiteur de l'activité kinase de KIT (voir paragraphe sur les inhibiteurs)<sup>73</sup>.

Le SCF active les **fonctions sécrétoires** des mastocytes humains. A lui seul, il peut induire la dégranulation des mastocytes<sup>74 75</sup>, ainsi que la production de cytokines pro-inflammatoires<sup>76</sup>. De plus, il potentialise la réponse des mastocytes induite par l'activation des récepteurs aux IgE (FcεRI), que ce soit en terme de dégranulation<sup>74 77</sup>, ou de production de cytokines pro-inflammatoires<sup>78</sup> et chemo-attractives. Par exemple, le SCF en combinaison avec des IgE stimule la production de CCL2<sup>79</sup>, de CCL22 et CCL17 (chimio-attractants des monocytes/macrophages et des lymphocytes) ainsi que celle des récepteurs aux chimiokines<sup>78</sup>.

Ainsi, pour les cellules mastocytaires, le SCF est un facteur de survie, un facteur de différenciation, un chimio-attractant, et un activateur fonctionnel. Le couple SCF/KIT joue donc un rôle majeur à la fois dans l'homéostasie du compartiment mastocytaire mais aussi dans ses fonctions.

*Pour un article de revue sur le sujet, consulter la référence <sup>80</sup>.*

Il est à noter que les rôles de la voie SCF/KIT sur les mastocytes peuvent être en grande partie transposées sur les éosinophiles <sup>81 82</sup>.

### **1-D- La voie SCF/KIT : un système de communication spécialisé**

Comme nous venons de le voir, la voie SCF/KIT intervient dans le développement et l'homéostasie de plusieurs lignages cellulaires durant l'embryogenèse mais aussi à l'âge adulte ainsi que dans une fonction vitale qu'est l'hématopoïèse. En conséquence, des dérèglements de la voie sont à l'origine de développements pathologiques. On distingue des pathologies liées à une perte de fonction de la voie ou à une diminution de son activité, et des pathologies liées à un gain de fonction de la voie c'est-à-dire à une hyperactivation ou à une activation incontrôlée. Des gains de fonctions de la voie SCF/KIT ont été incriminées dans des néoplasies impliquant toutes les cellules concernées par l'activation physiologique de la voie et seront détaillées dans la partie 4.

La voie SCF/KIT constitue un système de communication cellulaire, qui, comme tous les systèmes de communication générique comporte **un émetteur, un réseau de transmission de l'information et un receveur**. Les **cellules émettrices** qui produisent le signal SCF sont variées, fibroblastes (pulmonaires par exemple), cellules endothéliales, kératinocytes, cellules stromales hématopoïétiques (thymus et moelle osseuse) mais aussi d'autres organes comme la prostate, ICCs, cellules de Sertoli....Le signal SCF soluble transite dans les **liquides extracellulaires** mais aussi dans le sang et peut donc agir sur les cellules réceptrices de manière paracrine (à proximité, sur les cellules voisines), endocrine (le SCF transite par le sang) voire autocrine (cellules émettrices et réceptrices sont identiques comme dans le cas des

mastocytes). Il existe aussi une forme membranaire insoluble du SCF qui agit de façon juxtacrine (sur la cellule en contact).

Les **cellules réceptrices** sont elles aussi diverses, leur point commun étant l'expression de KIT, un récepteur membranaire de haute affinité pour le SCF, capable de réagir à de très faibles concentrations de ce dernier.

Quels sont les mécanismes par lesquels le signal ligand est converti en réponse biologique spécifique ? Comment un même signal peut-il entraîner des réponses biologiques différentes dans des cellules différentes ? Comment un signal peut-il avoir des effets pléiotropes au sein d'une même cellule ?

La partie 3 est consacrée à la description des mécanismes de transduction du signal, c'est-à-dire aux mécanismes de conversion du signal en effet biologique et tentera d'expliquer comment la spécificité de la signalisation est atteinte. Avant cela, la partie 2 est consacrée à la description de la topologie structurale et fonctionnelle du récepteur KIT et de son ligand le SCF.

## **1-E- Discussion**

Les facteurs de croissance sont souvent présentés comme des médiateurs locaux du système endocrinien. Cependant ils ne sont pas produits par des glandes, ne transitent que rarement dans le sang pour atteindre leur cible, et parfois même ne circulent pas du tout car ils sont exprimés en surface des cellules productrices. Ces considérations font que par définition, les facteurs de croissance ne peuvent pas faire partie du système endocrinien.

Ainsi, il existe un système de défense qu'est le système immunitaire, des systèmes de régulation à l'échelle de l'organisme que sont le système nerveux et le système endocrinien, et un système de régulation locale (à l'échelle des organes et tissus) qu'est le système des facteurs de croissance.

Le système des facteurs de croissance assure non seulement la coordination des fonctions cellulaires à l'échelle de l'organe ou du tissu mais aussi l'homéostasie cellulaire du compartiment. Il est impliqué dans le maintien de la balance entre la survie/prolifération et l'apoptose des cellules constitutives, permettant de maintenir la cohérence structurale et fonctionnelle des organes et des tissus. D'autre part, il est vraisemblable que ce système joue un rôle majeur dans la mobilisation des cellules souches ou pluripotentes qui entretiennent le pool cellulaire de nombreux organes et tissus.

## **Partie 2 : KIT, un récepteur à activité tyrosine kinase**

KIT est un récepteur à activité tyrosine kinase<sup>3</sup> dont le ligand est le facteur de croissance SCF (Stem Cell Factor)<sup>7</sup>. Les récepteurs à activité tyrosine kinase (RTK) sont des senseurs du milieu intérieur. Ce sont des récepteurs membranaires de haute affinité pour leurs ligands qui peuvent être des facteurs de croissance, des cytokines, ou des hormones. En fonction de la liaison avec leur ligand, ils sont capables d'induire des réponses cellulaires adaptées qui peuvent être très diverses. Ils interviennent dans de nombreux aspects de la physiologie cellulaire telle que la prolifération, la survie, la différenciation, le métabolisme, l'adhésion ou la migration.

L'activation des RTK se fait selon un mécanisme prototypique. La fixation des ligands initie une cascade de transduction du signal qui aboutit in fine à la réponse biologique. Les modalités de la transduction et de la signalisation intracellulaire initiée par KIT seront abordées dans la partie suivante.

Dans ce chapitre, nous présentons d'abord la structure du SCF (Stem Cell Factor). Ensuite nous détaillons la topologie structurale et fonctionnelle de KIT afin de rendre compte des mécanismes de reconnaissance initiale et de conversion du signal ligand.

### **2-A- Le ligand de KIT, le SCF**

Le ligand de KIT est le Stem Cell Factor (SCF), aussi appelé « kit ligand » (KL), « steel factor » (Sl) ou « mast cell growth factor » en fonction de l'origine de sa découverte<sup>83 84 7</sup>. Le SCF est codé par le locus *Sl* situé sur le chromosome 12 humain et 10 murin.

*Pour un article de revue sur le SCF, consulter la référence<sup>18</sup>.*

#### **2-A-1- Origine des formes solubles et membranaires du SCF**

**Le SCF est une glycoprotéine qui existe sous forme soluble ou membranaire**, les deux isoformes résultant d'un **épissage alternatif** conduisant à l'exclusion ou non d'un site de clivage protéolytique<sup>85</sup>.

Le **SCF soluble** (sSCF ou SCF<sup>165</sup>) provient du clivage protéolytique rapide dans l'exon 6 d'une glycoprotéine membranaire de 248aa (SCF<sup>248</sup>) (Figure 1).

Le clivage du SCF<sup>248</sup> pourrait dépendre de l'action de métalloprotéases<sup>86</sup> et jusqu'ici plusieurs d'entre elles ont été impliquées comme ADAM19<sup>87</sup>, ADAM33<sup>88</sup>, et MMP-9<sup>89</sup>.

Le SCF soluble circule sous forme d'homodimères non covalents hautement glycosylés<sup>90</sup> à la concentration plasmatique moyenne de 3,3 ng/mL<sup>91</sup>.

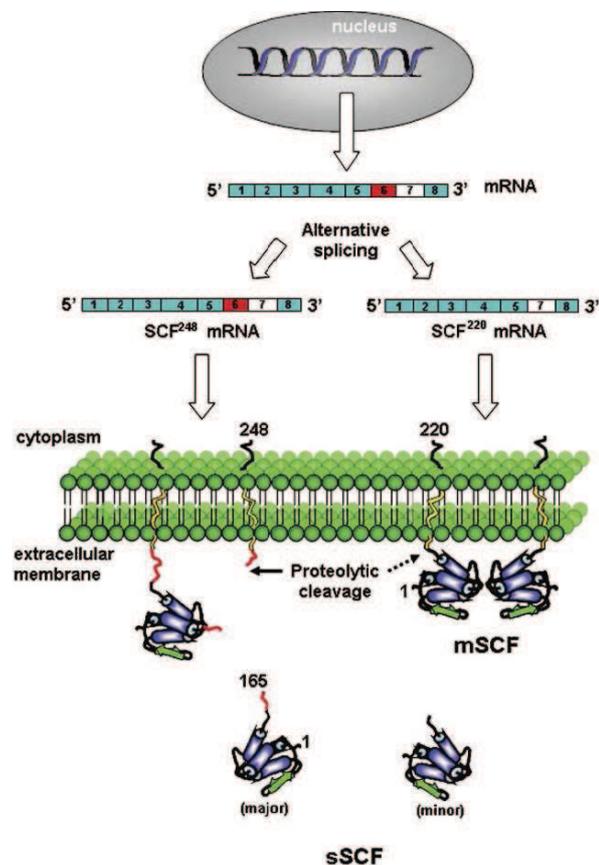
Le **SCF membranaire** provient de l'épissage alternatif de l'exon 6 qui conduit à une glycoprotéine de 220aa qui ne possède pas le site protéolytique et reste ancrée à la membrane (mSCF ou SCF<sup>220</sup>) (Figure 1).

Cette forme pourrait néanmoins être clivée au niveau de l'exon 7 pour générer une forme soluble<sup>92</sup>.

La question de savoir si le SCF membranaire forme des homodimères est ouverte.

### Figure 1 : Épissage alternatif du SCF

L'épissage alternatif de l'exon 6 de l'ARN messager codant le SCF conduit à deux formes protéiques membranaires de SCF (SCF<sup>248</sup> et SCF<sup>220</sup>). Le SCF<sup>248</sup> est clivé au niveau d'un site protéolytique contenu dans l'exon 6 (→) et libère le SCF soluble (sSCF ou SCF<sup>165</sup>). Le SCF<sup>220</sup> ou mSCF reste majoritairement ancré à la membrane, de part l'absence du site de clivage. Un clivage mineur peut se produire dans l'exon 7 (--->) pour libérer une forme soluble.



## **2-A-2- Distribution tissulaire des deux formes de SCF et régulation**

Les deux formes de SCF sont **biologiquement actives** mais le taux d'expression des deux formes varie considérablement en **fonction des tissus** <sup>93</sup>. En général, à l'âge adulte, la forme soluble est la forme prépondérante dans de nombreux organes. Par exemple, dans les conditions physiologiques, les fibroblastes pulmonaires <sup>69</sup> et les cellules musculaires lisses bronchiques <sup>94</sup> produisent préférentiellement du SCF soluble. Au contraire, les mastocytes et les cellules de Sertoli produisent préférentiellement du SCF membranaire <sup>95 96</sup>. Il existe donc une régulation de l'épissage alternatif du SCF qui dépend du tissu considéré.

Au sein d'un même tissu, le taux d'expression des deux formes de SCF peut varier en **fonction du stade de développement**. Cet exemple est documenté dans le cas de l'expression du SCF par les cellules de Sertoli durant la spermatogenèse adulte <sup>43</sup>. L'étude des souris *S/S<sup>d</sup>* a révélé l'absence de prolifération des cellules germinales à la puberté suggérant le rôle majeur du couple SCF/KIT dans la spermatogenèse adulte. Les spermatogonies de type A expriment KIT et sont dépendantes pour leur prolifération de la stimulation par le SCF produit par les cellules de Sertoli. Hors, les cellules de Sertoli expriment alternativement du SCF soluble ou du SCF membranaire au cours du développement des gonades males. La forme soluble est exprimée juste avant et après la naissance alors que la forme membranaire est majoritaire le reste du temps. De manière intéressante, il existe une excellente corrélation entre les périodes de division des PGCs et l'expression du SCF membranaire <sup>43</sup> (voir partie 4).

Une étude s'est intéressée aux mécanismes intervenant dans la **régulation de l'alternance entre les deux formes** et montre que le pH est un acteur clé de cette régulation dans les cellules de Sertoli.

La forme membranaire est exprimée à pH acide, tandis qu'une augmentation du pH favorise la synthèse de SCF soluble. Sur le plan physiologique, le pH acide est maintenu dans l'environnement des cellules de Sertoli par une production importante de lactate par ces cellules. A l'âge adulte, le cycle de développement des spermatogonies pourrait donc être dictée par l'expression de différentes formes de SCF à différents stades et cette régulation ferait intervenir le pH de l'environnement <sup>96</sup>.

## **2-A-3- Fonctions des deux formes de SCF**

L'allèle  $Sl^d$  (dickie) contient une délétion intragénique conduisant à l'expression exclusive de SCF soluble actif<sup>97 98</sup>. Les souris  $Sl^d/Sl^d$  sont viables mais présentent un phénotype sévère, avec des défauts de pigmentation, une anémie importante et une stérilité<sup>99</sup> suggérant un rôle non redondant des formes membranaires et solubles du SCF durant l'ontogenèse normale de ces compartiments (voir paragraphe 3-D-2-2-c).

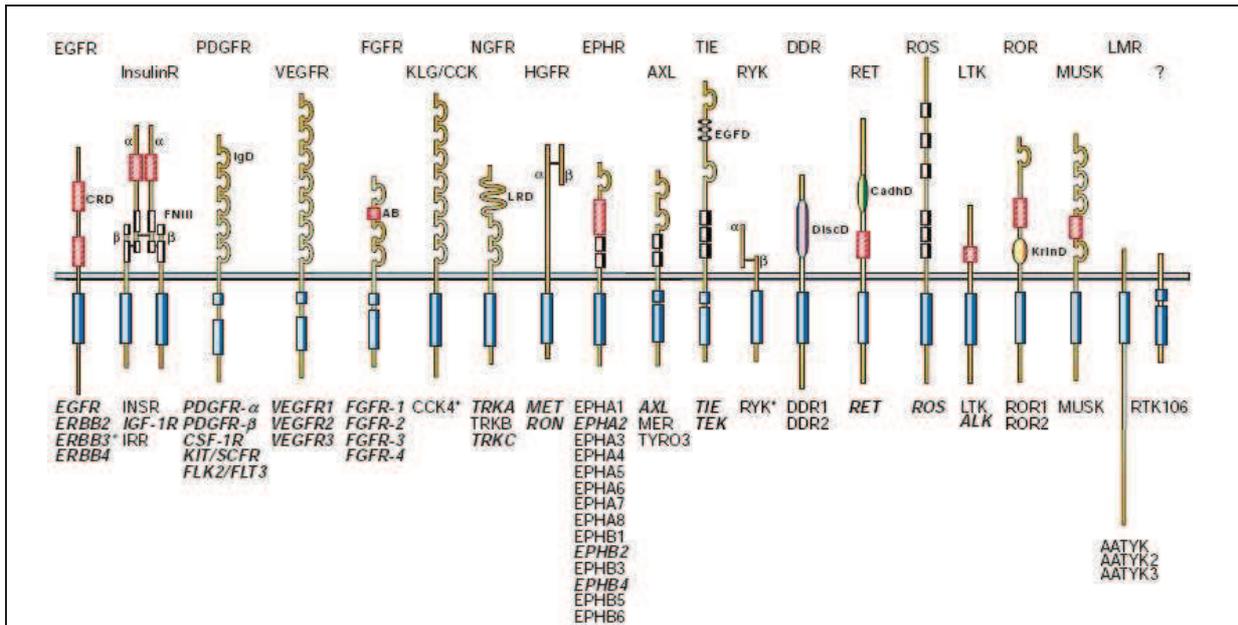
## **2-B- Topologie structurale et fonctionnelle du récepteur KIT**

### **2-B-1- KIT, un RTK de classe III**

Le génome humain porte 518 gènes codant des kinases, des enzymes capables de transférer le groupement  $\gamma$ -phosphate de l'ATP sur une molécule cible appelée substrat. En fonction du résidu sur lequel a lieu le transfert, on distingue les sérine/thréonine kinases et les tyrosine kinases. Parmi les 90 tyrosine kinases, 58 sont des enzymes membranaires appelées récepteurs à activité tyrosine kinase (RTK), les autres étant des enzymes cytosoliques<sup>100</sup>.

Les RTK sont regroupés en 20 classes (I à XX) ou familles sur la base de l'alignement de la séquence des domaines kinase<sup>101</sup>. Ces familles sont présentées dans la [figure 2](#), extraite de la référence<sup>102</sup>.

KIT appartient à la classe III, aussi appelée famille PDGFR, qui compte les récepteurs PDGFR $\alpha$ , PDGFR $\beta$ , FLT-3 et CSF1R (FMS). Les récepteurs de cette famille présentent une forte homologie structurale caractérisée par un domaine extracellulaire composé de cinq domaines de type Immunoglobuline (Ig-like), un domaine transmembranaire unique, et un domaine tyrosine kinase intracellulaire séparé en deux par une région hydrophile. La structure schématique de KIT est présentée [figure 3](#), extraite de la référence<sup>18</sup>.



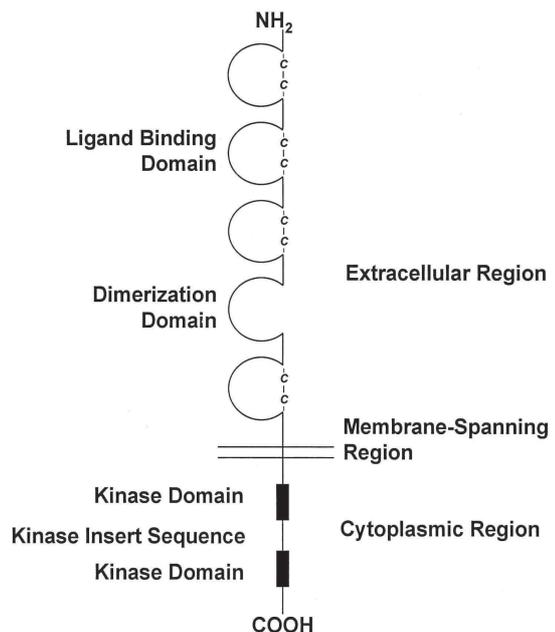
**Figure 2 : La famille des récepteurs à activité tyrosine kinase chez l'homme.**

Le nom du membre prototypique de la famille est indiqué au dessus tandis que les membres de chaque famille sont listés en dessous. L'astérisque signale les RTK dépourvus d'activité catalytique. Les membres signalés en italique gras sont ceux impliqués dans des pathologies humaines.

Abréviations: **AB**, acidic box; **CadhD**, cadherin-like domain; **CRD**, cysteine-rich domain; **DiscD**, discoidin-like domain; **EGFD**, epidermal growth factor-like domain; **FNIII**, fibronectin type III-like domain; **IgD**, immunoglobulin-like domain; **KrinD**, kringle-like domain; **LRD**, leucine-rich domain.

**Figure 3 : Domaines structuraux du récepteur KIT.**

Le domaine extracellulaire composé de cinq domaines Immunoglobuline-like (Ig-like) assure la liaison avec le SCF et la dimérisation. La région intracellulaire contient le domaine kinase séparé en deux par une région interstitielle.



Le **domaine extracellulaire** (ECD) de KIT comporte cinq domaines de type Ig dénommés D1 à D5 à partir de l'extrémité NH<sub>2</sub> de la protéine. Les structures cristallographiques de D1 à D3 (<sup>103</sup>) puis de D1 à D5 (<sup>104</sup>) obtenues en 2007 ont permis d'éclairer le rôle des différents domaines dans la fixation avec le ligand. Les études structurales montrent qu'un monomère de SCF interagit avec une seule molécule de KIT. Les épitopes d'interaction se trouvent à la fois dans D1, D2 et D3 et la fixation se fait par complémentarité de charges (liaisons hydrogènes, ponts salins, liaisons de Van Der Waals) (figure 4A).

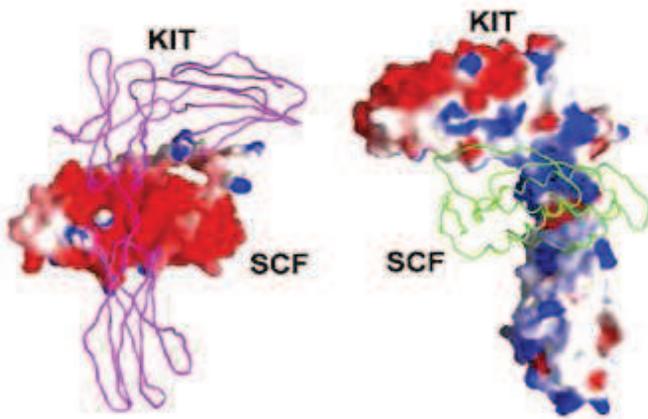
Cette complémentarité de charges est par ailleurs responsable de l'attraction entre le récepteur et son ligand. La cristallisation de D1 à D3 n'a pas mis en évidence d'interaction entre deux monomères de KIT (figure 4B). Yuzama *et al* ont obtenus les structures cristallographiques de l'ectodomaine entier de KIT complexé ou non avec le SCF <sup>104</sup>. Cette étude montre que les domaines D4 et D5 sont impliqués dans des interactions homotypiques entre deux monomères de KIT. La comparaison des structures de l'ectodomaine libre et complexé révèle que les domaines D1, D2 et D3 sont dans une configuration optimale pour la fixation du SCF avant même la liaison tandis qu'il existe un changement conformationnel important après la fixation permettant l'établissement de deux ponts salins entre les D4, et l'interaction successive entre les D5 (figure 5).

**Figure 4 :**

**Images issues de la cristallisation de l'interaction SCF-KIT (D1 à D3) <sup>103</sup>**

**A- Complémentarité de charges entre le SCF et KIT.**

Le SCF interagit avec une seule molécule de KIT. Les épitopes d'interaction se trouvent à la fois dans D1, D2 et D3 et la fixation se fait par complémentarité de charges. Dans le panel de gauche, la structure de KIT est représentée en squelette

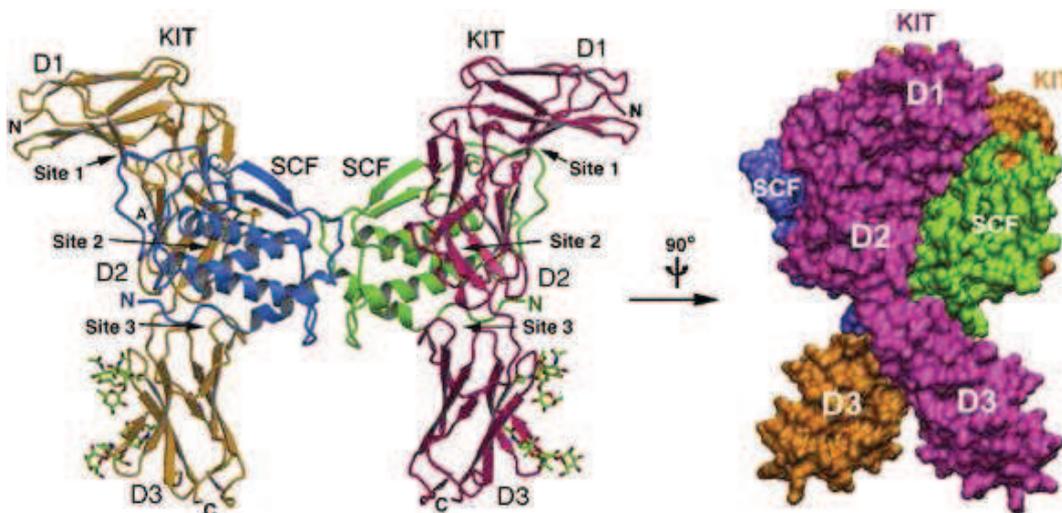


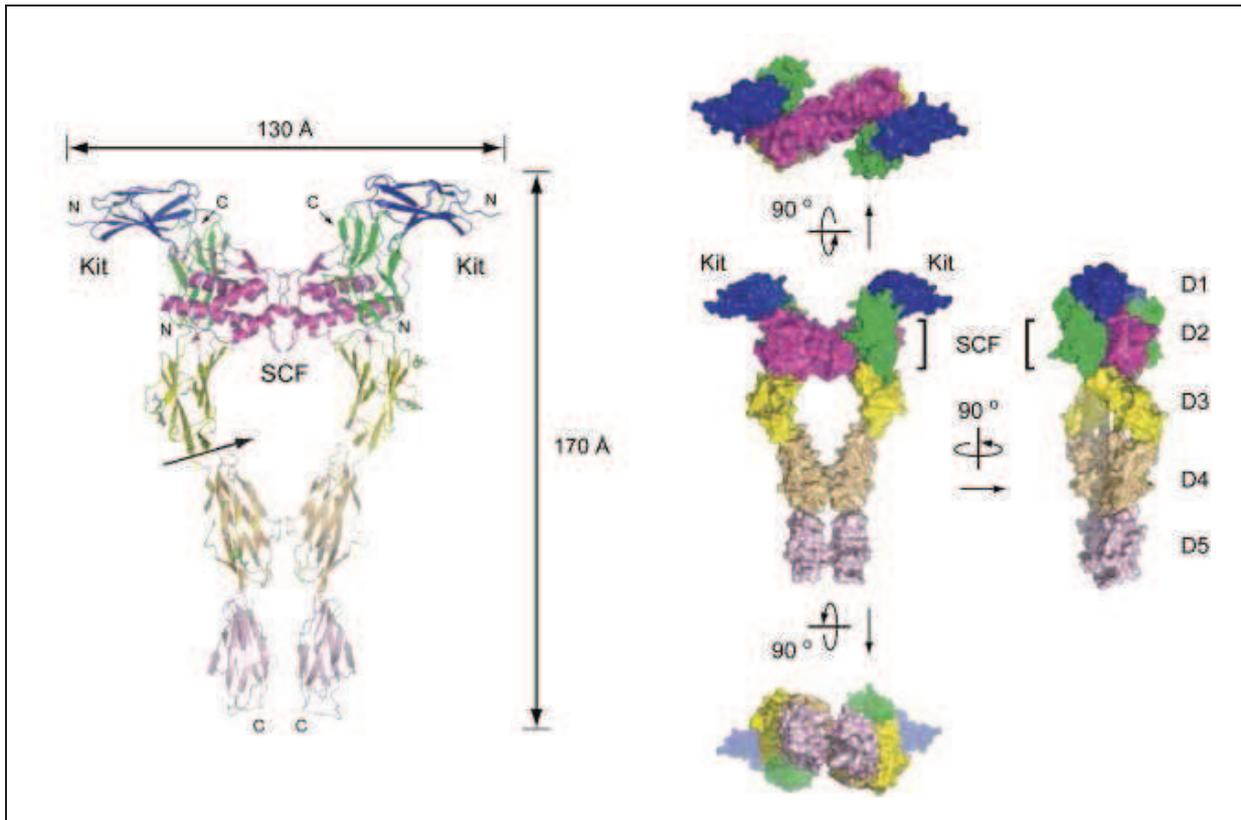
et celle du SCF selon une représentation GRASP coloré en fonction des potentiels électrostatiques, le bleu représentant une charge négative et le rouge une charge positive. Dans le panel de droite, les représentations sont inversées.

**B- Structure du complexe SCF/KIT.**

Les molécules de SCF apparaissent en bleu et vert et KIT en orange et fushia. (Gauche) Modèle en ruban du complexe binaire. Vue de face. (Droite) Représentation de surface du complexe. Vue de profil obtenue par rotation verticale de 90°.

La valeur des angles de la structure est de ~80° pour l'angle D1-D2 (soit presque perpendiculaire) et de ~150° pour l'angle D2-D3 (soit presque colinéaire).





**Figure 5 : Images de la structure du complexe binaire SCF/KIT (D1 à D5)**

Le SCF apparaît en fushia, et les domaines D1 à D5 de KIT en bleu, vert, jaune, beige et gris successivement.

(Gauche) Structure en ruban du complexe binaire 2:2 SCF-KIT.

La flèche indique une large cavité dans le complexe.

(Droite) Représentation de surface du complexe sous quatre vues, une vue de face et de profil, une vue de haut et une vue de bas dont les axes de rotation sont indiqués.

Les vues montrent que le dimère de SCF interagît de façon symétrique avec les domaines D1 à D3 de chaque monomère de KIT et que les domaines D4 et D5 de KIT établissent entre eux des interactions homophyliques (orange et rose respectivement).

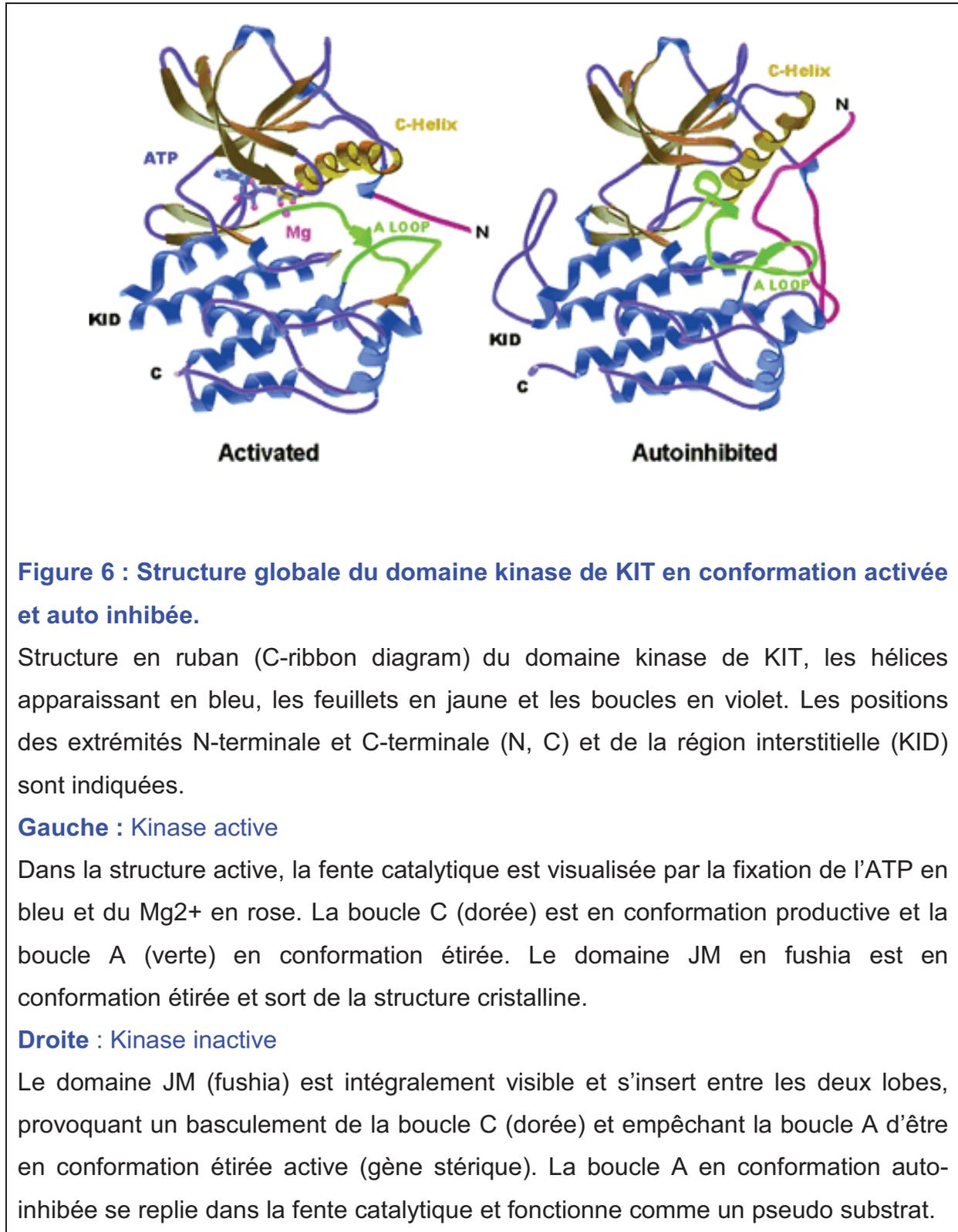
Le **domaine kinase** (KD) de KIT est un domaine divisé en deux par une région interstitielle. La structure cristallographique de la kinase active <sup>105</sup>, (figure 6 gauche), montre que le domaine kinase de KIT présente une <sup>105</sup>architecture bilobée caractéristique des kinases <sup>106</sup>. Le petit lobe à l'extrémité NH2 (N-ter) est essentiellement composé de feuilletts bêta avec une unique hélice régulatrice (C-

helix). Ce lobe, appelé « ATP-binding lobe » contient la boucle P (P-loop) qui assure la fixation de l'ATP et son orientation. Le grand lobe à l'extrémité COOH (C-ter) est composé d'hélices alpha. Ce lobe est impliqué dans la liaison aux substrats. Il contient la boucle d'activation caractéristique des kinases (A-loop) qui possède une tyrosine dont la phosphorylation stabilise la conformation ouverte de la boucle, permissive pour la fixation des substrats. Il s'agit de la tyrosine 823 de hKIT (842 pour hFLT3). Dans le cas de KIT, il apparaît que la phosphorylation de la tyrosine 823 n'est pas requise pour l'activité, contrairement aux autres kinases <sup>106</sup>. Cependant sa phosphorylation stabilise la conformation active et il semblerait que ce soit la dernière à être phosphorylée <sup>107</sup>. L'activité enzymatique phosphotransférase est portée par la boucle catalytique, située dans la fente entre les deux lobes.

Le **domaine juxtamembranaire** (JM) de KIT est un domaine particulier, de structure et de fonction caractéristique aux membres de la classe III. Dans une étude princeps, Chan et al ont décrit la fonction auto-inhibitrice de ce domaine sur l'activité kinase du récepteur <sup>108</sup>. La cristallisation du domaine JM intracellulaire a révélé une structure secondaire stable au repliement autonome. Leur étude biochimique montre qu'il interagit avec le lobe N-term de la kinase ayant pour conséquence l'augmentation du temps nécessaire à la kinase pour atteindre son activité maximale (inhibition cinétique). Le domaine JM contient un motif di-tyrosine particulier Y568-Y570. Lorsque ces tyrosines sont phosphorylées, la structure est perdue et le domaine ainsi déstructuré n'est plus capable d'interagir avec la kinase, entraînant une levée d'inhibition de l'activité. Cette étude suggère que la phosphorylation du domaine JM constitue la première étape permettant la transition vers une kinase active. Ces données ont été illustrées avec l'obtention de la structure cristallographique de la kinase inactive <sup>107</sup>. A l'état inactif ([figure 6 droite](#)), le domaine JM forme une épingle insérée dans la fente catalytique de la kinase obstruant l'entrée. Par ailleurs l'établissement de nombreuses liaisons conduit non seulement au blocage des deux lobes dans une configuration statique fermée mais aussi à l'inhibition du site catalytique. Le domaine JM agit donc comme un domaine auto-inhibiteur conformationnel par gêne stérique en cis.

Par des réactions d'autophosphorylation avec de la kinase purifiée (domaine intracellulaire) suivie d'une analyse par LC/MS/MS, Mol et al ont montré que les tyrosines Y568-Y570 sont phosphorylées en trans suite à l'activation du récepteur.

Cette phosphorylation est à l'origine de la libération du domaine JM, permettant l'accès à la fente catalytique.



## **2-B-2- Biosynthèse, Composition et Assemblage du récepteur**

KIT est codé par le locus *W* (white spotting) situé sur le chromosome 4 humain et 5 murin. KIT existe sous **plusieurs isoformes** dont les mieux caractérisées sont les isoformes GNNK+ et GNNK- qui résultent d'un épissage alternatif à la jonction exon/intron de l'exon9 résultant en la présence ou absence de la séquence GNNK dans le domaine extracellulaire <sup>109</sup>. Les deux isoformes sont souvent co-exprimées dans différents tissus, l'isoforme courte étant l'isoforme majoritaire <sup>110</sup>. Des études suggèrent une différence quantitative <sup>111 112</sup> et qualitative de signalisation entre ces deux isoformes <sup>113 114</sup>. Cependant, des analyses de lignées leucémiques <sup>110</sup> ou de patients atteints d'AML n'ont révélé aucune corrélation entre le ratio des deux formes et la pathologie <sup>115</sup>.

A l'état mature, **KIT est un récepteur hautement glycosylé**. Les chaînes oligosaccharidiques sont N-liées sur plusieurs asparagines du domaine extracellulaire <sup>116</sup>. La protéine subit une série de maturation dans le réseau d'adressage membranaire (voir paragraphe 5-B-2-1) avant de rejoindre la surface cellulaire. En surface, à l'opposé de certains RTK, il semble que **KIT reste à l'état monomérique** du fait des charges répulsives des domaines D4. Enfin, tout comme le SCF, KIT peut être clivé à la membrane et ainsi former du **KIT soluble**. Dans les mastocytes, la protéase TACE (ADAM17) pourrait être impliquée dans ce clivage <sup>117</sup>. Le KIT soluble est capable de fixer le SCF soluble <sup>118</sup> et pourrait agir comme compétiteur de la liaison entre le SCF et les formes membranaires de KIT <sup>119</sup>. Sa capacité à fixer le SCF membranaire n'est pas décrite. La concentration plasmatique de KIT soluble est de l'ordre de 300 ng/ml, c'est-à-dire 100 fois plus élevée que celle du SCF. L'implication physiologique de la liaison entre du KIT soluble et du SCF soluble n'est pas élucidée. Cependant, les thérapies ayant montré des variations respectives de ces deux paramètres, cette question fait l'objet d'un intérêt croissant <sup>120 121</sup>. En effet, au moins deux hypothèses totalement contradictoires peuvent être formulées : (i) le KIT soluble titre le SCF réduisant ainsi sa biodisponibilité (effet antagoniste) ou (ii) le KIT soluble prolonge la durée de vie du signal médié par le SCF en le protégeant de la dégradation. Par ailleurs, le KIT soluble est-il capable

d'activer des cellules exprimant du SCF membranaire, comme les cellules stromales par exemple ?

### **2-B-3- Activation de KIT par le SCF**

Le **mécanisme prototypique d'activation des RTK** est la **dimérisation** induite suite à la **fixation du ligand**. Cette activation conduit à la transphosphorylation sur tyrosine du récepteur permettant le recrutement et la phosphorylation d'effecteurs des voies de signalisation, initiant une cascade de transduction du signal (développé dans la partie suivante).

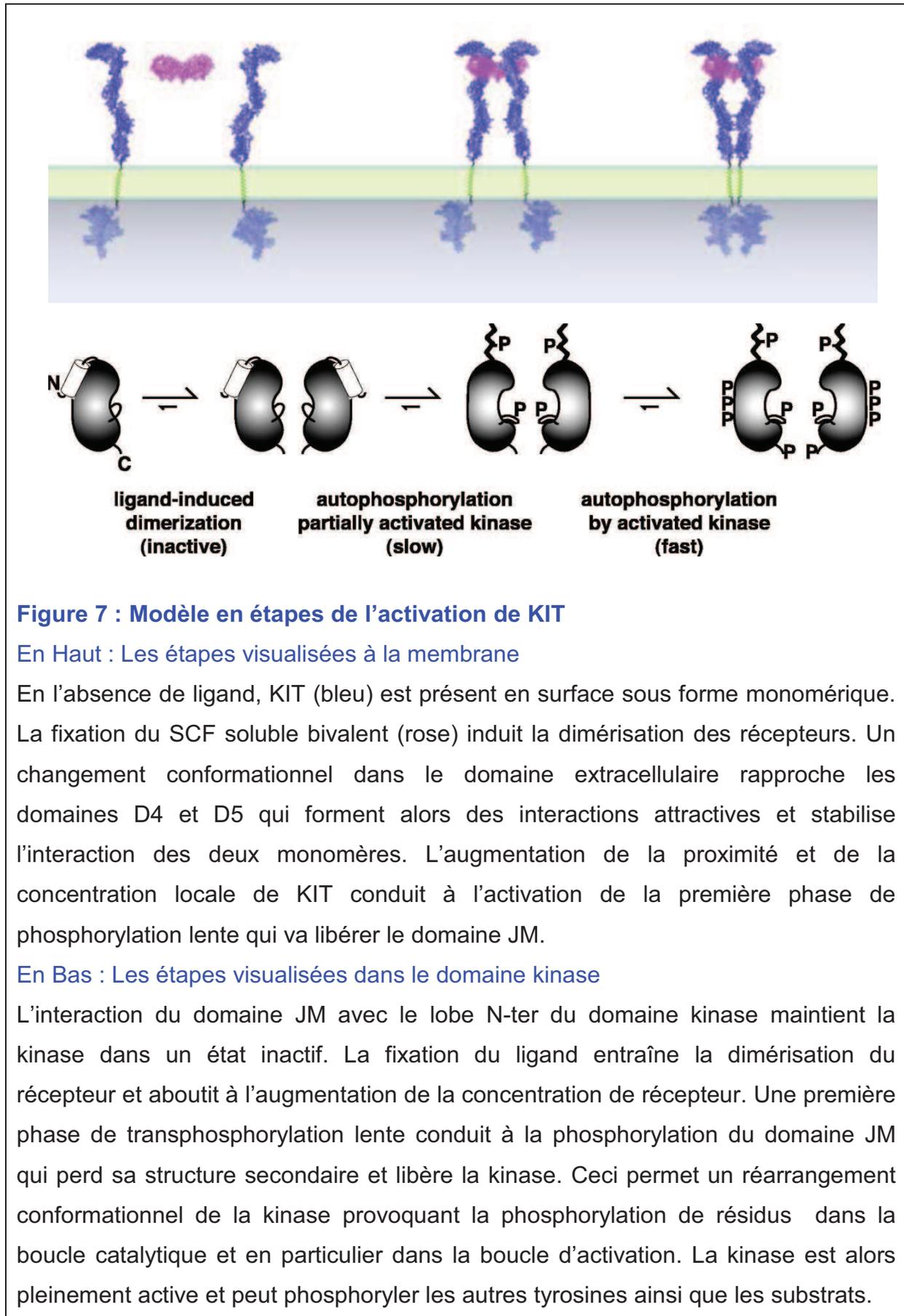
Si le mécanisme général d'activation des RTK est la dimérisation, les **modalités de cette dimérisation** varient d'un récepteur à l'autre. A l'exception du récepteur à l'insuline, les RTK sont présents à la surface cellulaire sous forme de monomères et la dimérisation est induite par la fixation du ligand, puis stabilisée par des interactions entre les 2 monomères. L'événement de dimérisation peut résulter de la **nature du ligand ou du récepteur**. Certains ligands sont bivalents, par association covalente comme l'homodimère de VEGF ou non covalente tel que le dimère de SCF. La dimérisation résulte alors de la nature bivalente du ligand. D'autres ligands sont monomériques et la dimérisation résulte donc de la nature des récepteurs. C'est le cas par exemple pour les récepteurs de la famille EGFR. Les récepteurs existent dans un état pré-dimérisé. La fixation des ligands induit un réarrangement structural de chaque monomère (rotation du domaine JM) conduisant à la stabilisation du dimère (augmentation de l'affinité entre les deux monomères) et à l'activation du récepteur <sup>122</sup>.

En fait, quelque soit le RTK considéré, il existe un équilibre membranaire entre les formes monomériques et les formes pré-dimérisées. Cet équilibre est largement en faveur des formes monomériques et la fraction des récepteurs dimérisés est insuffisante pour amorcer une signalisation intracellulaire. La fixation du ligand déplace l'équilibre en faveur des formes dimériques et conduit à une activation efficace de la signalisation. L'existence de cet équilibre est mise en évidence par l'activation des RTK obtenue suite à un traitement avec un inhibiteur de tyrosine phosphatases en l'absence de stimulation par le ligand <sup>123</sup>. Dans le cas de KIT par

exemple, le domaine D4 forme une surface hautement polarisée pour laquelle il existe un seuil de concentration local de monomères tel que les interactions répulsives intermoléculaires entre les domaines D4 deviennent attractives et conduisent à la formation d'un dimère en l'absence de ligand.

Le SCF est un dimère non covalent et la dimérisation de KIT est donc initiée simplement par la nature dimérique du ligand qui induit la formation d'un complexe 1:2 (ligand/récepteur). Cependant, pour KIT, comme pour les RTK de classe III, une contrainte supplémentaire est liée à la présence du domaine JM qui agit en cis comme un inhibiteur conformationnel. L'activation complète du récepteur nécessite la levée de cette inhibition et l'activation de KIT se fait donc en deux temps au cours desquels l'activité kinase augmente <sup>104</sup>. La première étape est l'étape de fixation du SCF les attractions électrostatiques entre le SCF et le module de liaison constitué des domaines D1-D2-D3 initient la liaison, puis, un changement de conformation du SCF renforce les interactions. Le SCF est alors fixé. Cette fixation induit un changement conformationnel du récepteur ; les domaines D4 se rapprochent transformant les interactions électrostatiques de répulsives à attractives (figure 7, haut <sup>104</sup>). Ce changement conformationnel initie l'activité kinase du récepteur. Il y a alors une première série de phosphorylations lentes, dont la phosphorylation du motif dityrosine du domaine JM. Il est alors déstabilisé et libère la contrainte inhibitrice imposée à la fente catalytique. La kinase est alors pleinement active, conduisant à une deuxième phase de phosphorylation rapide. De nombreuses tyrosines du domaine intracellulaire sont phosphorylées, dont la tyrosine de la boucle d'activation qui stabilise la conformation ouverte de la kinase et favorise l'accès des substrats (figure 7, bas <sup>108</sup>). La signalisation intracellulaire est alors enclenchée.

Il semblerait que les RTK ne soient pas distribués de manière homogène à la surface cellulaire mais plutôt clustérisés dans des microdomaines membranaires appelés radeaux lipidiques. Due à cette répartition, l'activation d'un RTK s'accompagne en réalité de l'oligomérisation des récepteurs. Ce point sera abordé au paragraphe 3-D-5-1-d.



## **Partie 3 : Signalisation intracellulaire activée par la voie SCF/KIT**

La **signalisation** est définie comme l'ensemble des mécanismes de communication au niveau cellulaire. Les molécules impliquées dans ces échanges assurent trois fonctions : (i) **transporter** de l'information via des signaux chimiques ; (ii) **décoder** les messages portés par ces signaux grâce à des récepteurs (communication intercellulaire proprement dite) ; et enfin, (iii) **transférer** les ordres contenus dans ces messages à la machinerie intracellulaire (communication intracellulaire).

Les voies de signalisation de type RTK sont impliquées dans des communications de proximité. En général, les signaux, c'est-à-dire les facteurs de croissance, sont des médiateurs chimiques solubles agissant par voie paracrine sur des cellules voisines qui expriment le récepteur du signal, c'est-à-dire le RTK. Les RTK sont impliqués dans le **décodage de l'information** délivrée par les facteurs de croissance.

La transduction du signal conduit à l'activation de différentes **voies de signalisation intracellulaire** aboutissant à des modifications cellulaires de nature transcriptionnelles et non transcriptionnelles, responsables de l'effet biologique.

La signalisation intracellulaire est de nature transitoire et différents mécanismes interviennent à la fois dans **l'atténuation et la terminaison** du signal émanant du récepteur.

La cellule répond de manière adaptée aux signaux qu'elle reçoit de son environnement. L'avant dernier paragraphe de cette partie est consacré à la description de mécanismes assurant la **spécificité de la réponse** à l'échelle du récepteur mais aussi à l'échelle cellulaire.

Enfin, nous verrons comment la **modélisation des réseaux de signalisation** pourrait améliorer la compréhension des mécanismes d'intégrations des signaux à l'échelle de la cellule et ainsi permettre de repérer les points de fragilité du réseau qui pourraient constituer des cibles thérapeutiques potentielles.

### **3-A- Décodage proximal du signal par les récepteurs**

Les RTK sont responsables du décodage de l'information transmise par leurs ligands. La **transduction du signal par le récepteur** (littéralement transformation d'une grandeur physique en une autre qui est fonction de la première) fait intervenir différents modules, un **module de transformation** du signal, un **module d'initiation** et un **module d'amplification et de propagation**.

#### **3-A-1- Conversion initiale et module de transfert**

##### 3-A-1-1- Phosphorylation du récepteur

Dans le cas des RTK, les **modules de transformation et d'initiation** du signal sont portés par le récepteur lui-même. La fixation du ligand sur le récepteur induit des modifications conformationnelles du récepteur conduisant à l'activation de son activité kinase. La conséquence immédiate de cette activation est la phosphorylation par le récepteur de ses propres tyrosines intracytoplasmiques. Ainsi la nature analogique de l'information portée par le ligand est transformée en un signal de nature digitale (une combinaison discrète d'événements de phosphorylations).

La **transduction** implique une proportionnalité entre l'intensité du signal d'entrée et celle du signal de sortie. La nature qualitative et quantitative des tyrosines phosphorylées doit donc pouvoir influencer la signalisation activée en aval. Cette question sera abordée [au paragraphe 3-D](#).

La phosphorylation de ces tyrosines initie le signal intracellulaire grâce au **recrutement de protéines impliquées dans la signalisation**. L'information est alors transférée du récepteur aux effecteurs.

### 3-A-1-2- Recrutement des partenaires de signalisation

#### a- Les domaines d'interaction protéine-protéine et la structure modulaire des protéines de signalisation

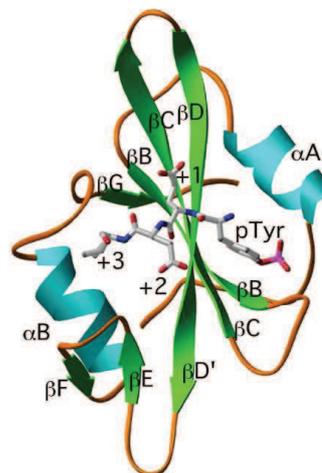
Les protéines impliquées dans la signalisation intracellulaire sont des **protéines de structure modulaire**. Elles contiennent en général plusieurs domaines qui s'assemblent et fonctionnent de manière indépendante des séquences alentours et sont capables d'interagir avec d'autres protéines par des interactions dites protéine-protéine. On dénombre une soixantaine de domaines impliqués dans des interactions protéine-protéine (voir le site internet « Pawson Lab »). **Les domaines majoritairement impliqués dans la signalisation intracellulaire sont les domaines SH2, PTB, SH3, et PH.** Ils sont présentés brièvement dans ce paragraphe.

*Pour des articles de revue sur le sujet, consulter les références <sup>124</sup>, (Pawson, 2009 #576).*

Les **domaines SH2** (Src-Homology 2) sont des domaines protéiques d'une centaine d'acides aminés de long, capables d'interagir avec une tyrosine phosphorylée dans un contexte d'acides aminés. Le site de liaison est bipartite, avec une poche responsable de la liaison avec la tyrosine phosphorylée contenant invariablement une arginine et une seconde poche plus variable qui reconnaît spécifiquement les acides aminés immédiatement après la tyrosine (de 3 à 6) (du côté de l'extrémité C-terminale, C-ter) (Figure 8).

**Figure 8 : Représentation en ruban de la structure d'un domaine SH2.**

Structure en ruban du domaine SH2 de SRC lié à un phosphopeptide représenté en gris dans lequel la position des acides aminés en aval de la tyrosine phosphorylée sont numérotés. Les hélices  $\alpha$  apparaissent en bleu, les feuillets  $\beta$  en vert et les boucles en orange.



L'utilisation de bibliothèques de peptides phosphorylés dégénérés a permis de définir la séquence préférée de différents domaines SH2 (tableau 1).

**Tableau 1: Séquence consensus reconnue par différentes protéines à domaine SH2.**

Φ représente un acide aminé hydrophobe ; X représente un acide aminé quelconque

Protéines de signalisation	Séquence Consensus
SYK (C-ter), ZAP70	Y(QTE)(QTE)L
PLCγ	YφX φ
p85 Sous-unité régulatrice de la PI3K	Y φ X M
LCK	Y E E I
SFK : SRC, FYN, FGR	Y E (E/N/Y)(IML)
GRB2	P X Y (V/I) N (V/I)
STAT1	YERQH

*In vitro*, la liaison d'un domaine SH2 avec son peptide préféré est une liaison de haute affinité ( $K_d = 10^{-100}$  nM), qui est réduite d'un facteur 1000 avec une séquence aléatoire. **L'affinité pour les peptides non phosphorylés est quasiment nulle.**

Pour un article de revue sur le sujet, consulter la référence <sup>125</sup>.

Ainsi la phosphorylation sur tyrosine agit comme un **interrupteur tout ou rien** pour la liaison d'un domaine SH2 et la séquence suivant la tyrosine phosphorylée assure la spécificité de la liaison avec un domaine SH2 particulier et donc avec une protéine de signalisation particulière.

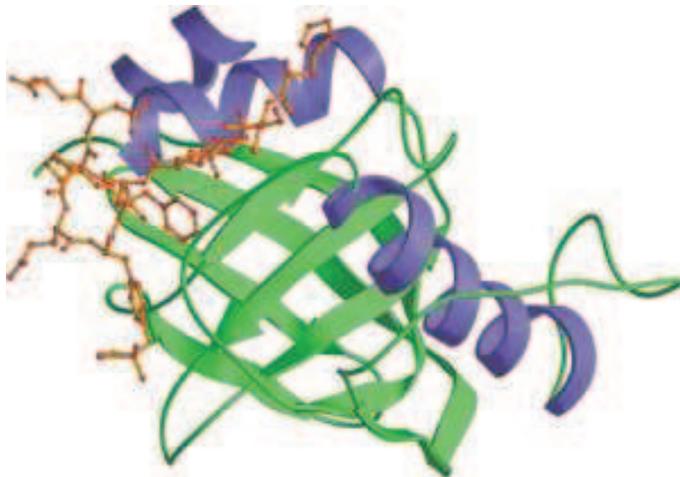
Les **domaines PTB** (PhosphoTyrosine Binding) sont des domaines protéiques de 100 à 150 acides aminés de long, qui reconnaissent eux aussi une tyrosine phosphorylée mais dans un contexte d'acides aminés N-ter <sup>126</sup>. La séquence consensus de fixation est Asn-Pro-X-Tyr, comme c'est le cas par exemple pour les domaines PTB des protéines SHC et IRS-1 (Figure 9). Cependant la majorité des

domaines PTB d'autres protéines se lient à ce motif (ou un motif proche) en absence de phosphorylation de la tyrosine. Les domaines PTB sont classés en deux familles en fonction de leur dépendance à la phosphorylation de la tyrosine, et cette dichotomie fonctionnelle correspond à une dichotomie structurale. D'autre part, les domaines PTB sont aussi capables d'interagir avec la tête des phosphoinositides. Ce sont donc des domaines bifonctionnels.

*Pour un article de revue sur le sujet, consulter la référence <sup>127</sup>.*

**Figure 9 : Représentation en ruban de la structure d'un domaine PTB.**

Domaine PTB de SHC lié à un phosphopeptide issu de TrkA représenté en rouge.

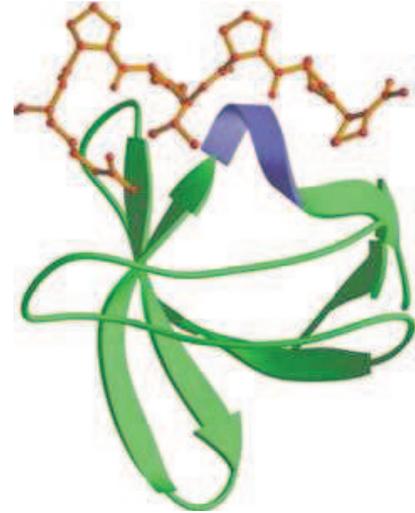


Les **domaines SH3** (Src-Homology 3) sont des domaines d'une centaine d'acides aminés de long, capables d'interagir avec des séquences riches en proline de consensus minimal PXXP. Le site de liaison est une poche hydrophobe qui contient des résidus aromatiques conservés, entouré de boucles variables chargées qui confèrent la spécificité de liaison (Figure 10). Ils sont divisés en deux classes en fonction du motif qu'ils reconnaissent, RKXXPXXP pour la classe1 et PXXPXR pour la classe2. Les affinités de liaison sont en général plus faibles que pour les domaines SH2 et sont surtout très variables ( $K_d = 5-100 \mu M$ ). Les domaines SH3 ne sont pas les seuls domaines à reconnaître des séquences riches en proline et par ailleurs, ils seraient les domaines possédant le plus de variations dans la spécificité de reconnaissance des séquences.

*Pour un article de revue sur le sujet, consulter la référence <sup>128</sup>.*

**Figure 10 : Représentation en ruban de la structure d'un domaine SH3.**

Domaine SH3 C-ter de SEM-5 lié à un motif polyproline issu de mSOS représenté en rouge.

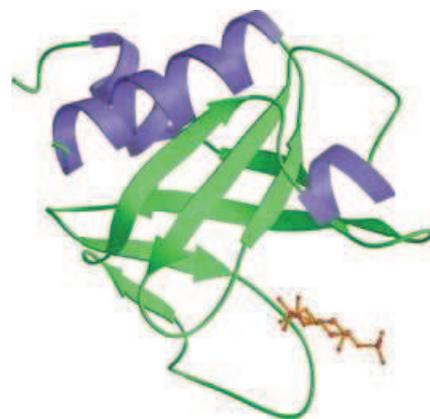


A la différence des interactions protéine-protéine impliquant des domaines SH2 ou PTB, les liaisons via les domaines SH3 n'impliquent pas de modification post-traductionnelle d'un des partenaires. Ce sont des interactions constitutives qui sont régulés par la localisation des partenaires.

Les **domaines PH** (Pleckstrin-homology) sont des domaines protéiques de 100 à 150 acides aminés, capables d'interagir avec des phosphoinositides. Ils possèdent des séquences variées mais une structure commune. Ils possèdent une poche basique (création d'une face chargée positivement) capable d'interagir avec le groupement phosphate de la tête des phosphoinositides. Certains domaines PH se lient à des phosphoinositides particuliers avec une haute affinité ( $K_d \sim nM$ ). La structure des domaines PH est très similaire de celle des domaines PTB (Figure 11).

**Figure 11: Représentation en ruban de la structure d'un domaine PH.**

Domaine PH de la PLC  $\delta_1$  de rat lié à l'IP3 (Ins(1,4,5)P<sub>3</sub>) représenté en rouge.



## **b- Assemblage du signalosome sur le récepteur activé**

Une fois activés, les RTK sont donc phosphorylés sur de nombreux résidus tyrosines de leur domaine intracellulaire. Ces tyrosines constituent le signal de recrutement de protéines à domaines SH2 et PTB et, dans la plupart des cas, leur environnement définit une certaine spécificité de recrutement pour des domaines SH2/PTB particuliers (c'est-à-dire par extension de protéines de signalisation particulières). Par exemple, la plupart des RTK contiennent un motif Y-X-X-M capable de recruter spécifiquement la sous-unité régulatrice de la PI3K lorsqu'il est phosphorylé.

Les protéines recrutées peuvent être classées en deux catégories ; celles possédant une activité enzymatique, et celles ne possédant pas d'activité enzymatiques, appelées **protéines adaptatrices**. Dans certaines circonstances, des enzymes peuvent aussi fonctionner comme des adaptateurs. Les adaptateurs purs tels que GRB2 et SHC ou la phosphatase adaptatrice SHP2 contiennent des combinaisons variées de domaines d'interaction protéine-protéine qui leur permettent d'interagir avec plusieurs protéines à la fois, ainsi qu'avec les phospholipides membranaires. L'ensemble des interactions médiées par les domaines d'interaction protéine-protéine favorise la création d'un complexe de signalisation compact autour du récepteur activé.

KIT contient 21 tyrosines intracellulaires, dont au moins dix sont phosphorylées suite à l'activation du récepteur. Ces tyrosines recrutent spécifiquement des protéines de signalisation à activité enzymatiques ou des adaptateurs. Le [tableau 2](#) détaille les partenaires d'interactions connus de KIT (humain ou murin) avec les références bibliographiques associées, hors tyrosines 568 et 570 dont les interacteurs sont présentés dans le [tableau 5 \(Chapitre 2, paragraphe 2-A-2-2\)](#). Les adaptateurs recrutés sont GRB2, GRB7, APS et LNK, CRK; les enzymes recrutés sont les membres de la famille des SRC kinases, les phospholipases gamma, les phosphatases SHP-1 et SHP1, et la PI3K.

**Tableau 2 : Les différentes tyrosines de KIT et leurs interacteurs connus.**

Résidu Tyrosine	Protéine	Cellules	Référence
h 703	GRB2	PAE Transfectées	Thommes, 1999 <sup>129</sup>
m 719	p85 (PI3K)	COS-1 Transfectées	Serve, 1994 <sup>130</sup>
		BMMCTransfectées	Serve, 1995 <sup>131</sup>
		BMMC koncked-in	Kissel, 2000 <sup>132</sup>
h 721	p85 (PI3K)	U2-OS Tranfectées	Blume-Jensen, 1998 <sup>133</sup>
m 728	PLCγ	32D Tranfectées	Gommerman, 2000 <sup>134</sup>
h 900	CRK	NIH3T3 Transfectées	Lennartsson, 2003 <sup>135</sup>
h 936	GRB2	PAE Transfectées	Thommes, 1999 <sup>129</sup>
	GRB7	PAE Transfectées	Thommes, 1999 <sup>129</sup>
	APS	COS-7 Transfectées	Wollberg, 2003 <sup>136</sup>

*Par la suite, la numérotation des résidus de KIT est faite sur la base de la séquence humaine.*

### **3-A-2- Amplification et propagation du signal en intracellulaire**

#### **3-A-2-1- Les protéines d’ancrage, un module d’amplification du signal**

Le signal émis au niveau du récepteur est amplifié par les **protéines d’ancrage**. Les protéines d’ancrage sont des protéines localisées à la membrane par leur extrémité N-terminale et situées à proximité des RTK. Cette localisation membranaire est médiée (i) par un domaine PH (famille GAB), (ii) par des lipides d’ancrage (comme par exemple la chaîne myristylée de FRS2), ainsi que (iii) par un domaine transmembranaire propre (famille LAT). Toutes ces protéines possèdent par ailleurs en C-ter de nombreuses tyrosines qui sont phosphorylés de manière directe ou indirecte suite à l’activation des récepteurs, ainsi que des motifs riche en proline. Ce sont des protéines multi-adaptatrices qui servent de plateforme de recrutement et augmentent ainsi le pool des molécules de signalisation recrutées (enzymes ou adaptateurs) à proximité du RTK activé.

Les **protéines adaptatrices** et les **protéines d’ancrage** agissent comme des nucléateurs et des ciments aboutissant à la formation d’un énorme complexe de

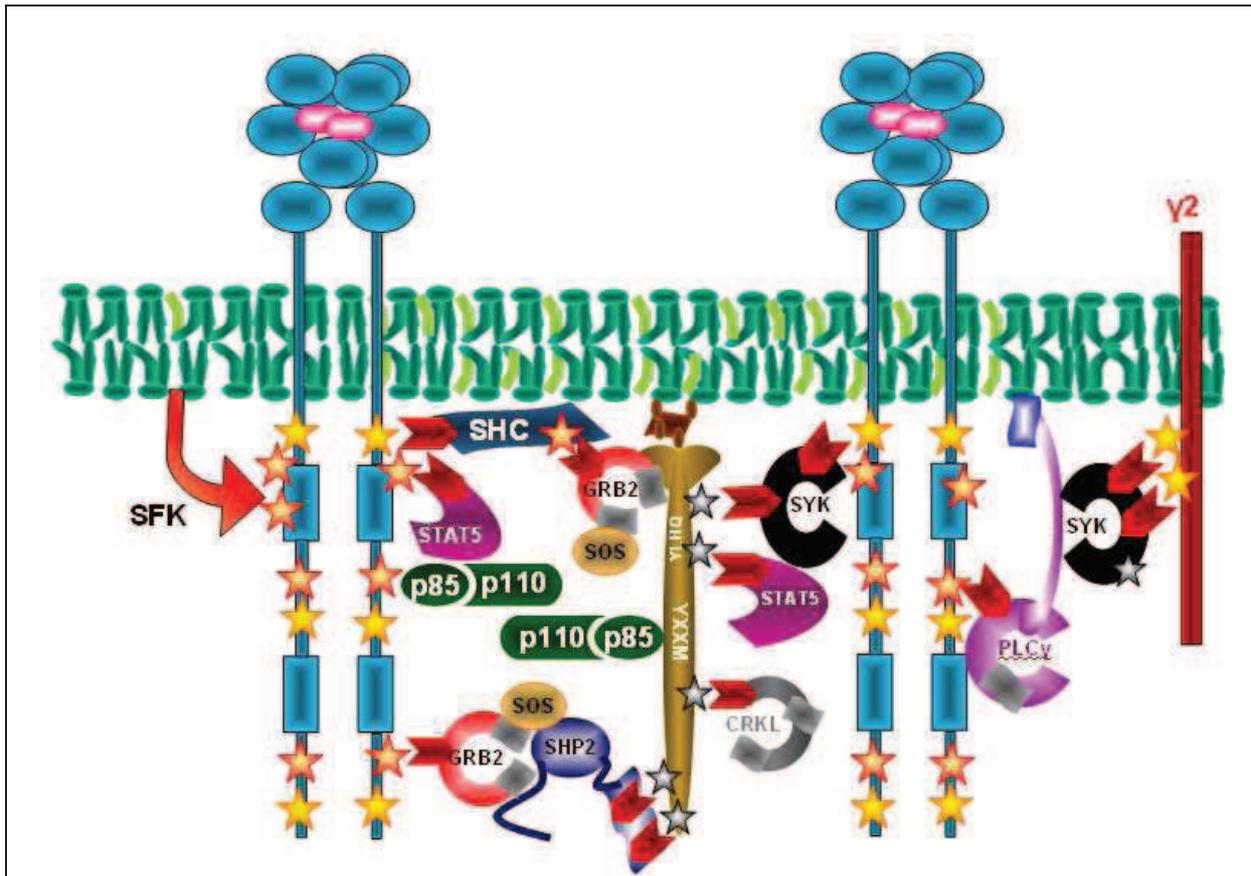
signalisation multiprotéique autour du récepteur activé appelé **signalosome**. Le signal issu de l'activation du RTK provient donc de la somme des molécules recrutées directement et des molécules recrutées sur les protéines d'ancrage, c'est-à-dire de **l'intégration du signal au niveau du signalosome**.

Par exemple dans **les mastocytes**, KIT est capable de phosphoryler les **protéines d'ancrage GAB2 et LAT2**. LAT2 contient neuf tyrosines intracellulaires, dont les tyrosines 110 et 118 qui sont phosphorylées directement par KIT, et d'autres, qui sont phosphorylées indirectement via l'activation des kinases de la famille SRC (SFK : SRC Family Kinases)<sup>137</sup>. GAB2 contient douze tyrosines qui sont phosphorylées suite à l'activation de KIT. Des études suggèrent que cette phosphorylation serait dépendante de l'activité des SFK, en tous cas d'un signal issue de la tyrosine Y567 de mKIT<sup>138</sup>. GAB2 et LAT2 sont capables de recruter de nombreux effecteurs de la signalisation conduisant à une amplification du signal et pouvant médier des effets biologiques différents. Ces protéines d'ancrage ont un rôle majeur dans la physiologie mastocytaire qui sera abordé au [paragraphe 3-D-3-1-b](#).

La [figure 12](#) illustre un signalosome imaginaire impliquant le récepteur KIT activé, la protéine d'ancrage GAB2 ainsi que la chaîne  $\gamma$  commune des récepteurs aux cytokines et leurs partenaires connus dans le mastocyte.

*Pour des articles de revue sur le rôle des membres de la famille GAB dans la signalisation, consulter les références<sup>139 140</sup>.*

*Pour un article de revue sur le rôle des membres de la famille LAT dans la signalisation, consulter la référence<sup>141</sup>.*



**Figure 12 : Signalosome KIT**

Représentation imaginaire schématique du signalosome de KIT. Le niveau proximal comporte deux récepteurs KIT, une chaîne  $\gamma$ c (chaîne  $\gamma$  commune aux récepteurs aux cytokines), une protéine d'ancrage de type GAB et une kinase de la famille SFK. Les protéines de signalisation recrutées sont la PI3K, la kinase SYK, le facteur de transcription STAT5, le complexe GRB2-SOS, la phosphatase SHP-2, les adaptateurs SHC et CRKL.

### 3-A-2-2- Rôle des effecteurs enzymatiques

La deuxième catégorie de protéines recrutées dans le signalosome (adaptateurs mis à part) sont les **effecteurs enzymatiques**.

On distingue trois grands mécanismes pouvant conduire à l'activation des effecteurs. Certains effecteurs sont activés par **phosphorylation**. C'est le cas par exemple de l'activation de la phospholipase C gamma (PLC $\gamma$ ) activée après

phosphorylation sur tyrosine. D'autres sont activés par un **changement conformationnel**. C'est le cas par exemple des kinases de la famille SRC (SFK). La liaison de leur domaine SH2 sur une phosphotyrosine permet l'ouverture et l'activation de la kinase. Enfin, certains effecteurs sont activés par la **translocation membranaire**. C'est le cas par exemple de l'activation de PDK1 et AKT. Ces mécanismes ne sont pas exclusifs et bien souvent agissent en synergie pour limiter l'activation aberrante des effecteurs. Ainsi la PLC $\gamma$  est d'abord transloquée à la membrane avant d'être activée par phosphorylation.

Les protéines recrutées sur le récepteur portent des activités enzymatiques de natures diverses. Il peut s'agir de protéines à activité tyrosine kinase (PTKs), de protéines à activité tyrosine phosphatase (PTPs), de phospholipases (PL), d'hydrolases comme les GAP ou d'ubiquitine ligase comme Cbl..... L'activité de chacune de ces enzymes conduit à la génération et à l'amplification d'un signal intracellulaire. Par ailleurs, certaines voies sont à l'origine de la génération de seconds messagers qui peuvent amplifier et diversifier le signal en donnant naissance à des signaux de natures différentes tels que le signal calcique ou le signal AMPc.

Ainsi, la première étape de la conversion du signal extracellulaire en signal intracellulaire est le recrutement spécifique de protéines de signalisation sur et autour du récepteur activé. La structure modulaire des protéines recrutées assure la formation d'une plateforme de signalisation appelé signalosome. Le recrutement et la mise en contact du RTK et des effecteurs conduit alors à la naissance des voies de signalisation intracellulaires. **En résumé, on peut dire que l'activation du récepteur se traduit par deux effets concomitants : (i) le recrutement des effecteurs de la signalisation et la formation d'un signalosome et, (ii) l'activation de ces effecteurs qui requiert ou non l'activité kinase du récepteur lui-même.**

De manière générale, la **signalisation intracellulaire** peut être vue comme une vague de propagation d'un signal de phosphorylation. La signalisation proximale fait essentiellement intervenir des phosphorylations sur tyrosine tandis que la signalisation distale est relayée par des sérine/thréonine kinases. A chaque étape de traitement du signal, le transfert du signal de phosphorylation résulte de l'équilibre

entre l'activité des kinases qui assurent le transfert du groupement phosphate et l'activité des phosphatases qui hydrolysent ce groupement. Par ailleurs ces réactions peuvent elles-mêmes être régulées via des effecteurs enzymatiques qui agissent de manière positive ou négative sur l'activité enzymatique. L'action de ces différents mécanismes de régulation contrôle ainsi la transmission du signal dans l'espace et dans le temps. Les mécanismes assurant la régulation et la spécificité de la signalisation intracellulaire seront abordées dans les paragraphes 3-C et 3D respectivement.

### **3-B- Les voies de signalisation intracellulaires activées par KIT**

La signalisation intracellulaire activée par KIT est un thème central des travaux effectués au cours de cette thèse. C'est pourquoi ce chapitre est introduit par un paragraphe sur les méthodes expérimentales généralement utilisées dans la caractérisation moléculaire et fonctionnelle des voies de signalisation intracellulaires.

Ensuite sont présentées successivement les grandes voies de signalisation activées en aval de KIT, d'abord par des généralités sur les protéines et les voies puis, en s'efforçant de montrer leur implication fonctionnelle dans le contexte de leur activation physiologique par la voie SCF/KIT.

Il est à noter que la majorité des résultats obtenus *in vitro* sur les voies de signalisation activées par KIT font suite à la stimulation du récepteur par du SCF soluble. Les données fonctionnelles issues des animaux transgéniques le sont dans le contexte physiologique du ligand, soluble ou membranaire selon les tissus. Des considérations concernant les effets différentiels de la stimulation de KIT par du SCF soluble ou membranaire sur la signalisation intracellulaire seront présentées au [paragraphe 3-D-2-2-c](#).

#### **3-B-1- Méthodes d'étude de la signalisation intracellulaire**

Différentes méthodes expérimentales permettent de déterminer l'implication d'une voie de signalisation dans une fonction cellulaire donnée.

C'est le cas des **inhibiteurs chimiques**. Ils peuvent fournir des informations intéressantes sur les conséquences fonctionnelles de l'activation d'une voie à condition d'être correctement employés. En effet, les inhibiteurs ont un spectre d'action plus ou moins large en fonction de la dose à laquelle ils sont utilisés, et sont donc plus ou moins sélectifs. A minima et lorsque c'est possible, il convient de vérifier l'inhibition de la protéine ciblée. Par ailleurs, pour une même voie de signalisation, plusieurs inhibiteurs sont disponibles et en raison de leur sélectivité, l'utilisation de certains est préférable à d'autres<sup>142</sup>. Enfin, les conclusions tirées d'une étude avec un inhibiteur doivent se référer à l'effet d'une protéine et non d'une

voie particulière. Aujourd'hui les inhibiteurs sont très utiles à des fins de criblage mais les conclusions biochimiques et fonctionnelles sur l'implication d'une voie doivent être étayées par des études complémentaires comme par exemple l'extinction protéique obtenue par ARN interférence.

Dans le cas des RTK, les tyrosines intracellulaires qui permettent le recrutement et l'activation des voies de signalisation sont souvent relativement spécifiques d'une voie. Les expériences de **mutagenèse ponctuelle des tyrosines** sont donc souvent utilisées. Une tyrosine spécifique est substituée en phénylalanine, le récepteur mutant est introduit dans des cellules qui en sont dépourvu et la comparaison biochimique et fonctionnelle est faite entre des cellules possédant le récepteur sauvage et celles ayant le récepteur mutant. Ces expériences ont souvent permis de dessiner grossièrement l'architecture des réseaux de signalisation intracellulaires activés par les RTK. Cependant deux écueils majeurs incombent à cette technique. Premièrement, étant donné la redondance qui peut exister sur l'activation de certaines voies de signalisation (voir le cas de la voie PI3K), on peut conclure à une absence d'effet alors que celui-ci existe. Mais surtout, chaque tyrosine peut recruter plusieurs effecteurs et l'effet observé s'il existe ne doit en aucun cas être attribué à l'effet d'une protéine spécifique mais à l'ensemble des partenaires recrutés sur le site. Cette dérive est systématiquement observée dans l'analyse du mutant Y<sub>568</sub>F de KIT, considéré uniquement comme le mutant défaillant pour l'activation des SFK (voir plus loin). Un moyen de palier le premier problème est d'utiliser une stratégie employée dans quelques études qui consiste d'abord à muter toutes les tyrosines intracellulaires en phénylalanine puis à réintroduire les tyrosines unes à unes (mutants « add-back »).

Pour étudier le rôle spécifique d'une protéine ou d'une voie, on peut **éteindre cette protéine/voie par ARN interférence**, les techniques de biologie moléculaire permettant d'obtenir des extinctions transitoires ou stables à l'aide de différents outils tels que les SiRNA (Small Interfering), les ShRNA (Short Hairpin) ou les miRNA (Micro). Comme mentionné précédemment pour les inhibiteurs, il convient de vérifier l'efficacité de l'extinction obtenue au niveau de l'ARN ou de la protéine. Les résultats les plus convaincants sont obtenus à l'aide de cellules éteintes pour cette protéine au niveau génique (cellules issues **d'animaux transgéniques knocked-out ou**

**knocked-down**). Par exemple, l'implication de nombreuses kinases dans les fonctions mastocytaires a été étudiée dans des mastocytes primaires issus de moelle osseuse de souris (Bone Marrow Derived Mast Cells-BMMCs) obtenus à partir de différents animaux transgéniques <sup>143</sup>.

Enfin, des informations précieuses sur l'implication fonctionnelle de différentes tyrosines (et donc par abus des différentes voies) dans différents compartiments cellulaires proviennent de l'étude **d'animaux transgéniques knocked-in**. Dans le cas de KIT, les animaux existants sont les animaux exprimant les récepteurs mutants mKIT-Y<sub>719</sub>F et mKIT-YY<sub>567-569</sub>FF <sup>132 144 145 146</sup>.

### **3-B-2- Descriptif des voies activées en aval du signalosome KIT**

*Pour un article de revue sur le sujet, consulter la référence <sup>147</sup>.*

#### **3-B-2-1- La voie PI3K/AKT**

##### **a- Généralités sur les PI3K**

Les phosphatidylinositol-3-kinases (PI3K) constituent une famille d'enzymes capables de phosphoryler le groupement hydroxyl en 3' du noyau inositol des phosphoinositides (PtdIns). Ce sont des **lipide kinases**.

Il existe **trois classes de PI3K**, la classe I étant la classe prototypique et celle préférentiellement activée par les RTK. Elles sont responsables de la production de phosphatidylinositol 3-phosphate (PI(3)P), de phosphatidylinositol (3,4)-bisphosphate (PI(3,4)P<sub>2</sub>), et de phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate (PI(3,4,5)P<sub>3</sub>) <sup>148</sup>. *In vivo*, leur substrat préféré est le PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> dont la phosphorylation produit le PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> <sup>149</sup>. Les PI3K de classe I sont des hétérodimères constituées d'une sous unité régulatrice et d'une sous unité catalytique. La classe IA est composée d'une sous unité catalytique p110 et d'une sous unité régulatrice p85 ou p85-like. Concernant les p110, il existe 3 isoformes p110 $\alpha$ ,  $\beta$ , ou  $\delta$  codées par 3 gènes *Pik3ca*, *Pik3cb*, et *Pik3cd* respectivement, p110 $\alpha$  et  $\beta$  ayant une expression ubiquitaire et p110 $\delta$  une expression hématopoïétique. Concernant les p85, il existe 5 isoformes, p85 $\alpha$ , p55 $\alpha$ , p50 $\alpha$ , qui proviennent de l'épissage alternatif du même gène *Pik3r1*, p85 $\beta$  (gène *Pik3r2*) et p55 $\gamma$  (gène *Pik3r3*). La sous unité p85 $\alpha$  est la plus

exprimée. La classe IB est formée d'hétérodimères p110 $\gamma$  catalytique et p101 régulatrice.

Toutes les PI3K sont **inhibées** par les drogues wortmannin et LY294002.

Par la suite, l'activation de la PI3K se réfère à l'activation des PI3K de classe 1A et plus précisément au couple p85 $\alpha$ /p110.

### **b- Signalisation par la Voie PI3K/AKT**

L'interaction de la p85 via son domaine SH2 sur une tyrosine phosphorylée d'un récepteur activé, d'un adaptateur ou d'une protéine d'ancrage, est responsable du recrutement de la p110 à proximité de la membrane où elle rencontre ses substrats. La voie classiquement activée en aval des PI3K est la voie AKT. La génération de PIP3 permet le recrutement des protéines de signalisation à domaine PH tels que PDK1, mTORc1 et AKT. Les serine/thréonine kinases PDK1 et mTORc1 phosphorylent AKT sur sa sérine 473 et sa thréonine 308 respectivement, conduisant à l'activation complète de la serine/thréonine kinase AKT. La voie PI3K/AKT a un rôle majeur dans la survie et le métabolisme cellulaire.

### **c- KIT et la voie PI3K**

La sous unité p85 $\alpha$  interagit par son domaine SH2 avec la tyrosine Y<sub>719</sub> du récepteur KIT murin<sup>130 131</sup> ou Y<sub>721</sub> du récepteur KIT humain<sup>133</sup>. Cette tyrosine est suivie d'une méthionine en position +3, et cette séquence YXXM constitue le motif consensus de fixation du domaine SH2 de p85. Ce motif est retrouvé sur quasiment tous les RTK mais aussi sur des protéines d'ancrage et de co-stimulation lymphocytaire.

Le rôle de la voie PI3K/AKT en aval de l'activation de KIT a été étudié dans des **cellules hématopoïétiques et non hématopoïétiques**.

Par exemple dans **les mastocytes**, deux types d'études ont été conduites afin de déterminer le **rôle fonctionnel de l'activation de la PI3K**. Les fonctions mastocytaires ont été analysées dans des mastocytes issus soit **d'animaux transgéniques knock-in KIT-Y<sub>719</sub>F** soit **d'animaux transgéniques knock-out *Pik3r1*<sup>-/-</sup>**. Il est à noter que jusqu'alors aucun partenaire autre que la p85alpha n'a

été décrit sur la tyrosine 719 de KIT et que c'est l'isoforme majoritaire dans les cellules hématopoïétiques.

Les animaux déficients pour la p85 $\alpha$  présentent un déficit de mastocytes matures dans la cavité intestinale et le péritoine <sup>150</sup>. Les mastocytes dérivés de la moelle osseuse (BMMC) ou du foie fœtal de ces animaux ont un défaut de prolifération SCF-dépendante mais la survie n'est pas affectée <sup>150 151</sup>. Les animaux knock-in Y<sub>719</sub>F ne révèlent quant à eux que des défauts très mineurs dans le compartiment mastocytaire, suggérant que la voie PI3K n'est pas nécessaire à leur prolifération <sup>132 144</sup>. Cependant, dans ces animaux, d'autres phosphotyrosines peuvent être impliquées dans le recrutement et l'activation de la voie PI3K comme ce pourrait être le cas via GAB2 <sup>114</sup> et l'effet pourrait donc être masqué par une redondance de la voie dans ce compartiment.

**La voie PI3K est donc nécessaire à la prolifération des mastocytes.** La question de savoir si elle est suffisante reste ouverte.

La reconstitution de BMMC déficients pour KIT avec le récepteur mutant Y<sub>719</sub>F a montré le rôle de la voie dans les fonctions effectrices SCF-dépendante des mastocytes telles que l'adhésion et la dégranulation <sup>152</sup>.

Les BMMC issus des animaux déficients pour la p85 $\alpha$  présentent un défaut de chimiotaxie vers le SCF <sup>153</sup> alors que la dégranulation purement IgE-dépendante n'est pas touchée <sup>150</sup>.

**L'activité PI3K semble donc impliquée dans les fonctions effectrices SCF-dépendante des mastocytes *in vitro* et *in vivo*.**

Les souris knock-in Y<sub>719</sub>F ont révélé des phénotypes discrets dans les compartiments hématopoïétiques. Cependant, elles ont aussi mis en évidence un **rôle fondamental non redondant de l'activation par KIT de la voie PI3K dans la fonction de reproduction**. En effet, les mâles comme les femelles ont un défaut de fertilité. Les mâles sont stériles à cause d'un blocage de la spermatogénèse et les femelles à un blocage durant le développement folliculaire <sup>132 144</sup>.

### 3-B-2-2- La voie PLC $\gamma$

#### a- Généralités sur les PLC

Les **phospholipases** sont des enzymes **hydrolysant les liaisons esters des phospholipides**. Les enzymes sont classées en fonction de leur site d'action sur la molécule. Les **phospholipases C** (PLC) interviennent sur la fonction ester liant le glycérol et le phosphate, libérant un diglycéride et un phosphoalcool. *In vivo*, les phospholipases C catalysent l'hydrolyse du phosphatidylinositol diphosphate membranaire (PIP2) en diglycéride et inositol-1-4-5-triphosphate (IP3). Les PLC de type gamma sont activés par les RTK. Il en existe deux isoformes PLC $\gamma$ 1 d'expression ubiquitaire et PLC $\gamma$ 2 d'expression restreinte au compartiment hématopoiétique <sup>154</sup>.

Le U-73122 est un **inhibiteur** des phospholipases C.

#### b- Signalisation par la voie PLC $\gamma$ /Ca<sup>2+</sup>/PKC

Les PLC $\gamma$  sont à l'origine de la production de deux seconds messagers cellulaires fondamentaux de la signalisation que sont le DAG et l'IP3. L'IP3 a un rôle critique dans la génération du signal calcique intracellulaire. Le DAG fixe et active les PKC.

Les souris déficientes pour PLC $\gamma$ 2 sont viables mais présentent un retard de croissance et des hémorragies internes. Ce problème est lié à un défaut d'agrégation plaquettaire. Plus généralement, toutes les fonctions dépendantes de l'activation des récepteurs de type Fc sont défailtantes comme par exemple la dégranulation des mastocytes ou l'ADCC médié par les cellules NK <sup>155</sup>. Enfin ces souris ont un défaut majeur dans le compartiment B, ressemblant beaucoup au défaut des souris Btk -/<sup>156</sup>.

#### c- KIT et la voie PLC $\gamma$

La PLC $\gamma$  interagit avec KIT via son domaine SH2 au niveau de la tyrosine 730 <sup>134</sup>. Il semble qu'elle ne soit activée que par le SCF membranaire <sup>157 134 158</sup>.

Le SCF protège les cellules qui expriment KIT de l'apoptose <sup>159</sup>. Des études sur l'effet protecteur du SCF contre l'apoptose induite par l'irradiation ou des agents cytotoxiques comme la daunorubicine impliquent la PLCgamma1 comme intervenant majeur <sup>160 161</sup>.

### 3-B-2-3- Les voies MAPK

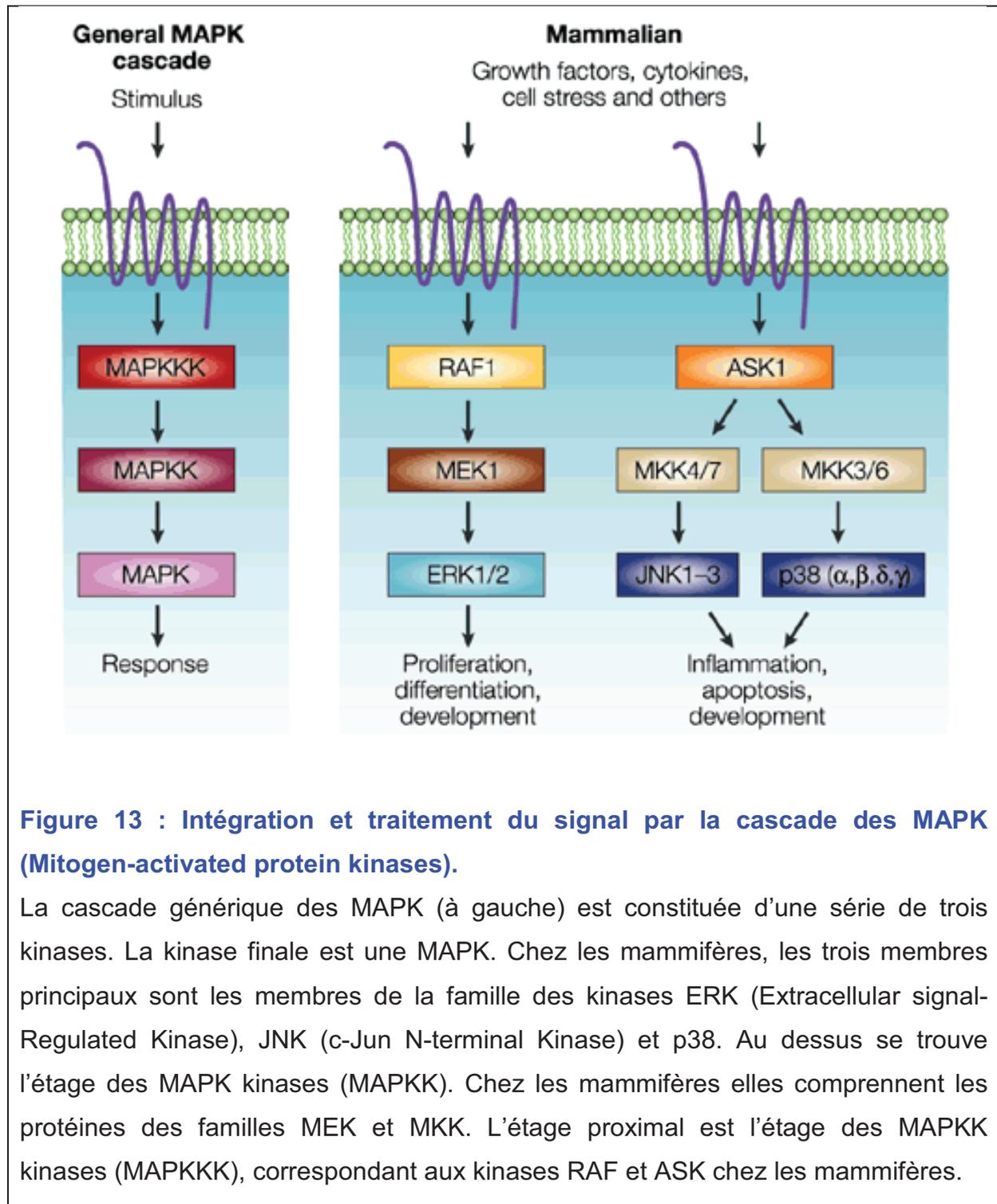
#### a- Généralités sur les voies MAPK

La cascade des MAPK est un module constitué de trois enzymes activées en séries. La première kinase activée est une MAP kinase kinase kinase (MKKK ou MAP3K). C'est elle qui relie le module aux stimuli extérieurs et/ou aux récepteurs membranaires. Elle active une MAP kinase kinase (MKK, MEKK, ou MAP2K) par phosphorylation sur résidus serine et thréonine. La MAP2K est une kinase à double spécificité qui active une MAP kinase par phosphorylation sur un résidu tyrosine puis sur une serine (figure 13, gauche). Les trois cascades de MAPK les plus étudiées sont les cascades (i) RAF-MEK1/2-ERK1/2, (ii) la voie conduisant à l'activation des MAPK p38, (iii) la voie d'activation des MAPK JNK1/2/3 (ou SAPK) (figure 13, droite).

Les inhibiteurs les plus fréquemment utilisés sont le U0126, un inhibiteur de MEK1 pour inhiber la voie ERK, le SP600125 pour inhiber la voie JNK et le SB203580 pour inhiber la voie p38. D'autres inhibiteurs sont par ailleurs disponibles <sup>142</sup>.

Tous les RTK activent la voie ERK via l'activation de la petite protéine G Ras, le membre prototypique de la famille Ras. Les petites protéines G sont actives lorsqu'elles sont liées au GTP et inactives lorsqu'elles sont liées au GDP (provenant de l'hydrolyse du GTP). L'hydrolyse du GTP est facilitée par l'action des protéines GAP (GTPase activating proteins) tandis que l'échange du GDP contre du GTP est catalysé par des protéines GEF (Guanine nucleotide exchange factors). Les GDI (Guanosine nucleotide dissociation inhibitors) maintiennent les petites protéines G dans un état inactif.

La route la mieux caractérisée pour l'activation de Ras est médiée par la protéine SOS qui est une GEF. **SOS est recruté à la membrane via son interaction constitutive avec GRB2. Celui ci se lie aux phosphotyrosines des RTK** activés directement ou via des adaptateurs, ou à des protéines d'ancrage phosphorylés. Ras activé interagit avec les kinases de la famille Raf provoquant leur activation par une succession d'étapes et l'enclenchement successif de la voie MAPK.



**Figure 13 : Intégration et traitement du signal par la cascade des MAPK (Mitogen-activated protein kinases).**

La cascade générique des MAPK (à gauche) est constituée d'une série de trois kinases. La kinase finale est une MAPK. Chez les mammifères, les trois membres principaux sont les membres de la famille des kinases ERK (Extracellular signal-Regulated Kinase), JNK (c-Jun N-terminal Kinase) et p38. Au dessus se trouve l'étage des MAPK kinases (MAPKK). Chez les mammifères elles comprennent les protéines des familles MEK et MKK. L'étage proximal est l'étage des MAPKK kinases (MAPKKK), correspondant aux kinases RAF et ASK chez les mammifères.

### b- KIT et les voies MAPK

SOS est lié de manière constitutive à GRB2 qui lui est capable d'interagir directement ou indirectement avec KIT. L'interaction directe a lieu au niveau des tyrosines 703 et 936<sup>129</sup>. GRB2 peut aussi être recruté via APS<sup>136</sup>, via SHP-2<sup>162</sup> et

via SHC <sup>163</sup>, tous décrits pour interagir de manière directe avec KIT sur les tyrosines 568 et 570.

Les expériences de « add-back » sur un récepteur KIT muté sur ces tyrosines intracellulaires ont révélé que la restauration du site 568-570 était suffisante à la restauration de l'activation de la voie ERK <sup>164</sup>. En accord avec ce résultat, les BMMC dérivés à partir des souris knock-in YY<sub>568-570</sub>FF présentent un défaut d'activation de la voie ERK <sup>145</sup>.

Par ailleurs, GRB2, ainsi que les autres adaptateurs décrits, peuvent aussi être recrutés sur GAB2, phosphorylé sur tyrosine suite à l'activation de KIT au moins dans les mastocytes <sup>165</sup>.

La voie ERK est impliquée dans la différenciation des cellules hématopoïétiques, et en particulier la cinétique d'activation de la voie semble pouvoir influencer le devenir cellulaire <sup>166</sup>. Son activation sous KIT doit avoir un rôle au cours du développement des différents lignages cellulaires dépendant de KIT mais cette fonction n'a pas été adressée directement. Les défauts phénotypiques des souris knock-in YY<sub>568-570</sub>FF semblent le suggérer mais d'autres voies de signalisation sont sans doute affectées dans ces souris ([confer Introduction de la partie 2 du chapitre 2 « Travaux expérimentaux »](#)).

### 3-B-2-4- La voie des SFK

#### a- Généralités sur les SFK

Src (prononcé « sarc », raccourci de sarcome) fut le premier proto-oncogène cellulaire découvert ([voir paragraphe 5-A-1-2-a](#)). Chez les mammifères, la famille des kinases Src (SFK) contient neuf membres, dont Src est le membre prototypique. Src, Yes, Fgr, Yrk, et Fyn sont les membres de la classe A, Lyn, Hck, Lck et Blk ceux de la classe B ([Figure 14, gauche](#)). Src, Fyn et Yes ont une expression ubiquitaire, tandis que les autres (Blk, Fgr, Hck, Lck et Lyn) sont exprimés plus spécifiquement dans certains tissus comme le compartiment hématopoïétique (pour un article de revue consulter la référence <sup>167</sup>). Ces kinases partagent une structure et un mode d'activation commun. De l'extrémité N-terminale vers l'extrémité C-terminale on trouve un domaine SH3, un domaine SH2, un domaine de liaison (linker) et le domaine catalytique ([Figure 14, bas](#)). *C'est le domaine SH2 de SRC qui est le*

prototype ayant conduit à la description des domaines SH2, qui lui doivent leur nom. Dans la boucle d'activation du domaine catalytique se trouve la tyrosine d'activation caractéristique des kinases (résidu Y416 pour SRC). On trouve une deuxième tyrosine phosphorylable (résidu Y527 pour SRC) à l'extrémité N-terminale des protéines. Enfin, toutes possèdent à l'extrémité N-terminale au moins une séquence d'ancrage membranaire de nature variable.

**Figure 14: La famille des SFK**

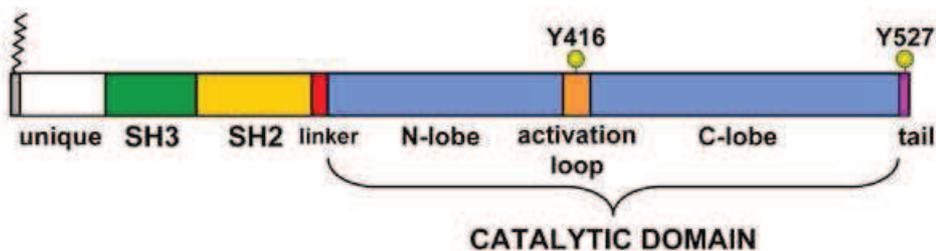
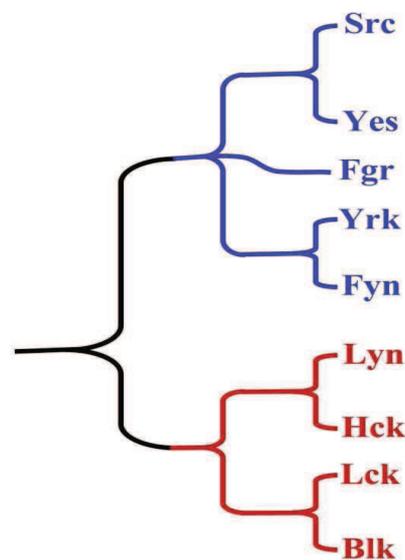
**Droite :** Arbre phylogénétique des SFK

La classe A, dont le membre prototypique est SRC en bleu ; la classe B dont le membre prototypique est LYN en rouge.

**Bas :** Schéma général des domaines structuraux des membres des SFK.

Les kinases possèdent à l'extrémité N-terminale une chaîne lipidique de nature variée permettant l'ancrage membranaire. De N vers C, les kinases possèdent un domaine SH3, un domaine SH2 et le domaine kinase. Le domaine kinase est

divisé en deux lobes qui ensèrent la boucle d'activation qui contient la tyrosine d'activation caractéristique des TKs (en position 416 pour SRC). L'extrémité C-terminale contient une tyrosine d'inactivation (en position 527 pour SRC).



A l'état inactif, les SFK présentent une structure fermée compacte maintenue par deux interactions protéine-protéine intramoléculaires. La tyrosine C-terminale (résidu Y527 pour SRC) est phosphorylée et interagit avec le domaine SH2, facilitant l'interaction du domaine SH3 avec un motif polyproline situé dans le domaine linker. Cette liaison est responsable d'une rotation de la kinase qui empêche l'alignement des résidus catalytiques et donc l'activation. Les kinases responsables de la phosphorylation de la tyrosine C-terminale inhibitrice sont les kinases CSK ou CHK (dans les cellules hématopoïétiques). Les SFK présentent donc une structure conformationnelle auto inhibée qui peut être levée par (i) la déphosphorylation de la tyrosine inhibitrice (ii) la liaison compétitive du domaine SH2 à une autre phosphotyrosine, (iii) la liaison compétitive du domaine SH3

*Pour un article de revue sur le sujet, consulter la référence <sup>168</sup>.*

Les **inhibiteurs** de SFK fréquemment utilisés sont le SU6656, PP1, et PP2 <sup>142</sup>. Les résultats obtenus à l'aide de PP1 et PP2 sous la stimulation de KIT doivent être pris avec précaution étant donné que PP1 et PP2 sont aussi des inhibiteurs de KIT <sup>169</sup>. Le dasatinib (inhibiteur de la forme activée de KIT<sup>D816</sup>) est aussi un très bon inhibiteur des SFK <sup>170</sup>.

## **c- KIT et les SFK**

### *Remarques préliminaires*

L'activation des SFK est présentée ici de manière générale, souvent sans préciser le membre de la famille concernée. De fait, beaucoup d'études ne le précisent pas. En outre, l'outil sérologique utilisé pour détecter l'activation des SFK (anticorps spécifique de la phosphotyrosine 416 signant l'activation des SFK) reconnaît tous les membres activés de la famille sans distinction. La kinase impliquée est précisée lorsque l'étude le mentionne.

Dans des BMMC, la kinase majoritaire est LYN ; FYN et HCK étant présentes en quantité dix fois et vingt fois moindre respectivement <sup>171</sup>.

**L'engagement de KIT avec du SCF entraîne l'activation des SFK dans le système hématopoïétique** <sup>172</sup>. KIT et les SFK sont associées après activation de

KIT<sup>172</sup> et cette interaction est dépendante de l'association du domaine SH2 des SFK avec la phosphotyrosine pY568 et le motif biphosphorylé ppY568-570<sup>173 163 174</sup>.

La grande majorité des études portant sur **l'analyse des conséquences biochimiques et fonctionnelles de l'activation des SFK par KIT** sont basées sur **l'analyse des mutants YY<sub>568-570</sub>FF** (perte de l'interaction et de l'activation des SFK). Dans cette partie nous ne présenterons que les **résultats obtenus hors de ce contexte**. En effet, d'autres interacteurs étant décrits sur le site, il nous semble trop réducteur d'analyser ces mutants dans la seule perspective de l'activation des SFK. Une présentation détaillée des différents interacteurs et des fonctions du site dityrosine est faite en introduction du travail sur ce site effectué au cours des travaux de cette thèse (partie 2 des résultats).

Une première étude utilisant des oligonucléotides antisens dirigés contre l'ARN messager de LYN suggère son implication dans la prolifération SCF-dépendante<sup>172</sup>. Ensuite d'autres études adressant le **rôle de l'activation des SFK dans les fonctions cellulaires dépendantes de KIT dans les mastocytes** ont été réalisées en analysant **des BMMC issues de souris déficientes pour lyn, fyn et hck** (BMMC *lyn*<sup>-/-</sup>, *fyn*<sup>-/-</sup> et *hck*<sup>-/-</sup> respectivement).

Les BMMC déficientes pour **fyn** révèlent le rôle fondamental de la kinase dans la réorganisation du cytosquelette d'actine durant la migration dirigée vers le SCF des mastocytes<sup>175</sup>.

Les BMMC déficientes pour **hck** ont un défaut de prolifération SCF-dépendante en culture même si les souris *hck*<sup>-/-</sup> n'ont pas de défaut visible dans le compartiment mastocytaire<sup>171</sup>.

Les résultats issues des études sur les BMMC **lyn**<sup>-/-</sup> sont contradictoires. Plusieurs études suggèrent le rôle de lyn dans la régulation négative de la prolifération SCF-dépendante des mastocytes, corrélant avec une augmentation du nombre de mastocytes tissulaires dans les souris *lyn* déficientes<sup>176</sup> ainsi que dans la régulation négative de la dégranulation<sup>177</sup>. Cependant une étude plus ancienne montrait un défaut de prolifération et de migration SCF-dépendante des BMMC *lyn*<sup>-/-</sup><sup>178</sup>.

Les autres études portant sur l'implication des SFK dans la **prolifération** médiée par KIT<sup>174 173 179 164</sup>, et la **migration** vers le SCF<sup>180 164</sup> utilisent les récepteurs mutants YY<sub>568-570</sub>FF et sont détaillées plus loin. Enfin, une étude portant sur l'implication des SFK dans l'**internalisation du récepteur**<sup>181</sup> et est discutée au [paragraphe 3-C](#).

### 3-B-2-5- La voie JAK/STAT

#### a- Généralités sur les JAK

Les JAKs (Janus Kinases) sont des tyrosine kinases cytoplasmiques ([Figure 15, haut](#)). Chez les mammifères, la famille JAK comporte quatre membres, JAK1, JAK2, JAK3 et TYK2. Les kinases JAK sont majoritairement impliquées dans la transduction des signaux issus des récepteurs aux cytokines. Ceux-ci ne possèdent pas d'activité kinase propre et ce rôle est assuré par un ou plusieurs des membres de la famille JAK associé de manière constitutive avec le récepteur.

**JAK1** est impliquée dans la signalisation de nombreux récepteurs aux cytokines. Les études biochimiques montrent son implication dans la signalisation des récepteurs à IL-2 et à l'IL-4, les récepteurs de la famille gp130 et les récepteurs aux cytokines de classe II. JAK1 est impliquée dans une signalisation ayant des effets fonctionnels pléiotropes et le phénotype des souris *jak1* *-/-* est en conséquence létal très rapidement après la naissance.

**JAK2** est impliquée dans la signalisation des récepteurs à chaîne unique tel que le récepteur à l'Epo (EpoR), la famille des récepteurs à l'IL-3, la famille gp130 et les récepteurs aux cytokines de type II (IFN-gamma en particulier). Le phénotype des souris *jak2* *-/-* est embryonnaire létal, mimant celui des souris *Epo* *-/-*. Ces souris présentent un défaut dans l'érythropoïèse embryonnaire, suggérant le rôle fondamental de JAK2 dans la signalisation sous EpoR.

**JAK3** est majoritairement exprimée dans le compartiment hématopoïétique et les études biochimiques ont montré que la kinase JAK3 est impliquée dans la transduction des signaux issus de tous les récepteurs aux cytokines qui utilisent la chaîne gamma commune. *In vivo*, JAK3 joue un rôle fondamental dans le développement du compartiment lymphoïde et dans la fonction des mastocytes.

**TYK2** est impliquée dans la signalisation sous le récepteur à l'interféron alpha. Les souris déficientes pour *tyk2* ne présentent pas un phénotype sévère mais ont un défaut majeur dans la réponse des cellules Natural Killer (NK).

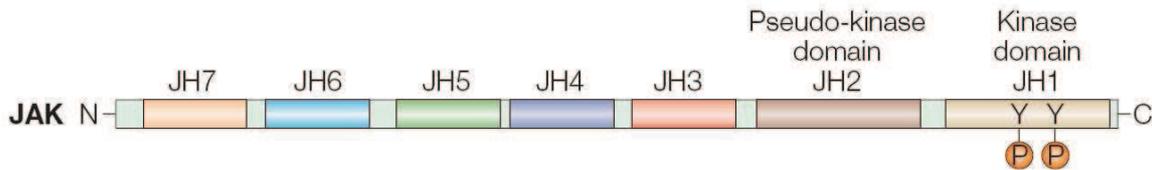
### **b- Généralités sur les STATs**

Les STAT sont des facteurs de transcription qui transduisent l'effet de nombreuses cytokines (STAT : Signal Transducers and Activators of Transcription). Au repos, ce sont des protéines cytoplasmiques qui sont sous forme inactive mais, suite à leur **activation canonique par les JAK**, ils sont recrutés au niveau des récepteurs aux cytokines via leur domaine SH2 et sont phosphorylés sur tyrosine par les JAK. Suite à cette phosphorylation, ils se dimérisent par association réciproque de leur domaine SH2 et de la tyrosine phosphorylée et sont transloqués dans le noyau. Ils se fixent alors sur des promoteurs spécifiques induisant la transcription de gènes cibles.

Chez les mammifères, il existe sept membres, STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5A, STAT5B, et STAT6. Tous présentent le même arrangement structural de différents motifs qui sont : (i) un domaine NH<sub>2</sub>-terminal, (ii) un domaine d'interaction protéique de type coiled-coil (CC), (iii) le domaine de liaison à l'ADN (DBD: DNA Binding Domain), (iv) un domaine de liaison (linker), (v) un domaine SH2, (vi) un domaine de transactivation (TAD: Transactivation Domain) qui contient la tyrosine phosphorylable ([Figure 15, bas, extraite de la référence <sup>182</sup>](#)).

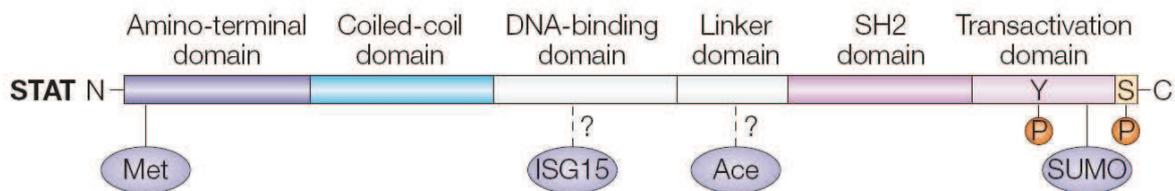
Un paragraphe est consacré aux protéines STATs en [introduction de la partie 1 du chapitre 2 «Travaux expérimentaux »](#).

**Figure 15 : Schéma structural prototypique des membres de la famille des kinases JAK et des facteurs de transcription STATs.**



**Représentation schématique des domaines structuraux des JAKs.**

Les domaines JH1 à JH7 sont définis par homologie de séquence entre les 4 membres de la famille JAK. Le domaine JH1 est le domaine kinase qui contient deux tyrosines phosphorylées suite à l'engagement des récepteurs par leurs ligands. Le domaine JH2 est le domaine pseudo substrat. Les domaines JH6 et JH7 sont impliqués dans la liaison des JAKs avec les récepteurs.



**Représentation schématique des domaines structuraux des STATs**

Des modifications post-traductionnelles peuvent réguler l'activité des STATs. Les sites de phosphorylation sur tyrosine et sérine (P), le site de méthylation (Met) et de sumoylation (SUMO) ainsi que les sites putatifs de l'ISGylation (ISG15) et d'acétylation (Ace) sont indiqués.

**c- KIT et la voie JAK-STAT**

La stimulation de KIT par le SCF s'accompagne de la phosphorylation de JAK2 qui est associée de manière constitutive avec le récepteur<sup>183 184 185</sup>. Des expériences utilisant des oligonucléotides antisens<sup>184</sup> ou des progéniteurs issus du foie fœtal de souris JAK2 déficientes montrent que cette activation est essentielle à la prolifération médiée par la voie SCF/KIT<sup>186</sup>. Suite à l'activation de KIT, STAT1, STAT5A et STAT5B sont recrutés sur le récepteur et phosphorylés sur tyrosine<sup>187</sup>. Ceci s'accompagne d'une augmentation de leur liaison à l'ADN<sup>188 189</sup>.

Cependant, il existe des résultats contradictoires sur l'activation de la voie JAK-STAT en aval de KIT et celle-ci n'est pas observée dans d'autres études. Par exemple, dans des lignées de cellules érythroïdes, la stimulation par le SCF seul n'active pas la voie JAK2/STAT5 spécifiquement activée par la stimulation de EpoR<sup>190 191</sup>. De la même manière, dans une lignée de mastocytes murins, l'activation de la voie JAK2/STAT5 est observée sous stimulation IL-3 mais pas par le SCF<sup>192</sup>.

L'activation de la voie JAK/STAT sous stimulation SCF pourrait dépendre du type cellulaire considéré<sup>186</sup>. D'autre part, des paramètres expérimentaux critiques tels que la nature de la stimulation (dose et temps d'observation) et la présence d'inhibiteurs de phosphatases peuvent influencer le résultat.

Nous montrons une activation rapide et transitoire de STAT1, STAT3 et STAT5 sous stimulation SCF dans des BMMCs. Voir la figure 1 de l'article « *Mechanisms of STAT protein activation by oncogenic KIT mutants in neoplastic mast cells* » présenté en [première partie du chapitre « Travaux expérimentaux »](#). La phosphorylation sur tyrosine des protéines STATs est dépendante de l'activité kinase de KIT mais le rôle des JAKs dans cette activation n'a pas été testé.

**Nous avons ici présentées les voies de signalisation classiquement étudiées sous KIT. Cependant d'autres voies de signalisation existent et sont probablement activées dans certains contextes que de futures études ne manqueront pas de mettre en lumière.**

### **3-C- Les mécanismes d'atténuation et de terminaison de la signalisation intracellulaire**

L'équilibre entre l'enclenchement et l'arrêt des voies de signalisation intracellulaire est indispensable à la réalisation des fonctions cellulaires. La balance est assurée grâce à des boucles de rétrocontrôles négatives. L'existence de ces boucles garantit que l'activation elle-même enclenche en retour les mécanismes d'arrêt, permettant la régulation et la stabilité dynamique du système. Les mécanismes de rétrocontrôles sont nombreux. On distingue les mécanismes d'atténuation du signal qui agissent par des modifications réversibles et les mécanismes de terminaison irréversibles qui détruisent les molécules impliquées dans la signalisation intracellulaire. Les modules de rétrocontrôle peuvent agir sur le récepteur ayant initié la réponse et/ou sur les composants des voies de signalisation. Dans ce paragraphe nous décrivons les **mécanismes généraux d'atténuation et de terminaison du signal ayant lieu au niveau du récepteur**. Nous verrons par ailleurs dans la partie suivante que ces mécanismes sont aussi responsables de la modulation spatiale et temporelle du signal et qu'ils participent ainsi à la spécificité de réponse de la signalisation intracellulaire.

Ces mécanismes ont un rôle fondamental dans l'équilibre de la signalisation intracellulaire et ainsi dans l'homéostasie cellulaire. Toute perturbation peut être à l'origine d'un dérèglement pathologique. Les mécanismes d'échappement à la terminaison du signal sont en particulier fréquemment rencontrés dans les cancers (voir partie 5).

#### **3-C-1- Généralités sur l'atténuation du signal RTK**

Les mécanismes généraux d'**atténuation** de la signalisation intracellulaire activée par un RTK **au niveau du récepteur** lui-même sont (i) la liaison avec des **ligands antagonistes**, (ii) **l'inhibition de l'activité kinase** du récepteur, (iii) la **déphosphorylation des tyrosines d'ancrage** par les tyrosine phosphatases. La terminaison ultime de la signalisation par le récepteur est liée à sa dégradation irréversible suite à son endocytose (d'après la référence <sup>193</sup>).

L'existence de **ligands antagonistes** est documentée pour le récepteur Tie2, dont l'effet du ligand Ang1 est modulé par Ang2, les deux étant requis pour une angiogenèse normale <sup>194</sup>.

La suite de ce paragraphe est consacrée à une description détaillée des mécanismes d'atténuation et de terminaison de la signalisation intracellulaire activée par la voie SCF/KIT au niveau du récepteur.

### **3-C-2- Mécanismes d'atténuation de la signalisation initiée par KIT**

#### **3-C-2-1- Inhibition de l'activité kinase du récepteur**

##### **a- Par les PKC**

##### **Généralités sur les PKCs**

La famille des PKC (environ 10 isoenzymes) est une famille de sérine/thréonine kinase dont l'activité est contrôlée par des seconds messagers. Elle est divisée en trois familles selon les messagers requis : les PKC conventionnelles ou classiques (PKC $\alpha$ ,  $\beta$ <sub>I</sub>,  $\beta$ <sub>II</sub>, et  $\gamma$ ) sont activées par le calcium Ca<sup>2+</sup>, le DAG et un phospholipide ; les nouvelles PKC (nPKC : PKC $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\eta$ , et  $\theta$ ) sont activées le DAG seul ; les PKC atypiques (aPKC : PKC $\iota$  et  $\lambda$ ) ne sont activées ni par le DAG, ni par le Ca<sup>2+</sup>.

Comme vu précédemment, les seconds messagers Ca<sup>2+</sup> et DAG sont libérés par l'activité enzymatique des PLC $\gamma$  par les RTK.

Les PKC ont été impliquées dans la régulation négative de plusieurs RTK <sup>195</sup> <sup>196</sup>. Cependant, si aujourd'hui il est clair qu'elles interviennent dans la désensibilisation suivant l'activation des GCPR (G-Coupled Protein Receptor), leur rôle dans l'atténuation du signal RTK est beaucoup moins définie.

##### **Régulation de KIT par les PKC**

Les PKC sont capables de phosphoryler KIT sur les résidus sérine 741 et 746 dans le domaine interstitiel ce qui inhibe l'activité kinase du récepteur par un mécanisme inconnu <sup>196</sup> <sup>197</sup>. D'autre part, les PKC induisent un clivage protéolytique du domaine extracellulaire de KIT <sup>198</sup>. Les données sur la régulation de l'activité

kinase de KIT par les PKC sont des données relativement anciennes qui n'ont pas été reprises.

## **b- Par les Tyrosine Phosphatases**

### **Généralités sur les PTP**

Les protéines tyrosine phosphatase (PTP) sont des enzymes capables d'hydrolyser spécifiquement les groupements phosphate liés à des résidus tyrosine (phosphohydrolase). La superfamille des PTPs est caractérisée par un motif consensus qui définit le site catalytique de l'enzyme (HC(X)<sub>5</sub>R). Elle est divisée en deux classes, les tyrosine phosphates classiques et les phosphatases à double spécificité tyrosine mais aussi sérine/thréonine (DSPs). Les 37 PTPs classiques sont divisées en deux familles, l'une membranaire (receptor-like PTPs = RPTPs, il en existe 12), l'autre cytoplasmique (PTPc). Les RPTP sont capables de se dimériser, ont des ligands capables d'activer une cascade de transduction de signal, et interagissent avec la matrice extracellulaire et avec d'autres cellules par des interactions homotypiques. L'étude des RPTP est un domaine en extension qui ne sera pas abordé ici.

*Pour un article de revue sur le sujet, consulter la référence <sup>199</sup>.*

### **Régulation des RTK par les PTP**

De manière générale, les protéines tyrosine phosphatase (PTPs) sont impliquées dans la régulation négative du signal issu des RTK, et ce, que les RTK soient activés ou non par leur ligand. En l'absence de ligand, elles ont un rôle fondamental dans le maintien des RTK à un faible niveau d'activation. Ceci est vrai à la membrane, comme l'atteste le fait que l'on peut activer n'importe quel RTK par un traitement avec un inhibiteur de tyrosine phosphatases tel que le pervanadate <sup>123</sup>, mais aussi au cours du transit intracellulaire durant la biosynthèse, comme c'est le cas par exemple de la phosphatase PTP-1B qui déphosphoryle le récepteur FLT3 en cours de synthèse <sup>200</sup>. La suite de ce paragraphe est consacrée à la description de **la régulation négative par les PTPs des RTK activés par leur ligand.**

Comme mentionné précédemment, les tyrosine kinases possèdent dans la **boucle d'activation** une tyrosine caractéristique dont la phosphorylation stabilise la conformation active des kinases <sup>106</sup>. La déphosphorylation de cette tyrosine par une

tyrosine phosphatase conduit donc à une inhibition de l'activité kinase du récepteur. Les phosphatases peuvent aussi déphosphoryler des tyrosines intracellulaires des récepteurs impliquées dans le recrutement et l'activation des voies de signalisation intracellulaires. Ces deux fonctions ne sont pas exclusives et il est très difficile de les distinguer. Le rôle des PTP est décrit dans ce paragraphe mais concerne donc aussi le paragraphe sur l'inhibition de l'activité plateforme des récepteurs. Par ailleurs les PTPs sont aussi impliquées dans la régulation de la spécificité de la signalisation et leur rôle sera abordé au [paragraphe 3-D](#).

Les démonstrations les plus convaincantes du rôle des PTP dans la régulation spécifique de certains RTK proviennent de **l'étude de souris déficientes**.

Par exemple, la souris déficiente pour PTP-1B a une sensibilité accrue à l'insuline, suggérant le rôle de la phosphatase dans la régulation négative du signal issu du récepteur à l'insuline (IR)<sup>201 202</sup>.

### Régulation de KIT par les PTP

Les **souris 'motheaten' (me)** et 'viable motheaten' (*mev*) sont des souris portant des mutations naturelles dans le gène PTP1C codant la tyrosine phosphatase SHP-1<sup>203</sup>. Les souris *me* présentent une expansion de multiples populations hématopoïétiques conduisant à une immunodéficiences sévère et une auto-immunité systémique létale à l'état homozygote. Ceci met en évidence le rôle fondamental de la phosphatase SHP-1 dans la régulation de la croissance et du développement des cellules du système hématopoïétique. De plus, chez les souris *mev*, on observe une augmentation de la fréquence de lymphomes.

L'implication de SHP-1 dans la régulation du signal de KIT provient des études de complémentations intergéniques réalisées en **croisant les souris me et Wv**<sup>204</sup><sup>205</sup>. Les souris *Wv* portent une mutation hypomorphe dans KIT conduisant à une perte de fonction partielle de l'activité kinase du récepteur qui n'est pas létale mais est associée entre autre à des défauts de pigmentation (phénotype white-spotting) et de fonctionnement du tractus gastro-intestinal. L'amélioration de l'un ou l'autre des phénotypes *Wv* et *me* dans les croisements a démontré le rôle de SHP-1 dans la régulation négative de KIT *in vivo* dans le compartiment hématopoïétique.

L'interaction de KIT et SHP-1 est dépendante de l'activation de KIT par le SCF<sup>206</sup>, et a lieu au niveau de la tyrosine 569 du domaine JM<sup>207</sup>.

SHP-1 est aussi impliquée dans la régulation négative des signaux initiés par EGFR <sup>208</sup> et par FMS <sup>209</sup>. De manière générale, il n'existe **pas de sélectivité absolue des PTPs vers les RTK**, une même PTP pouvant agir sur plusieurs RTK et vis et versa. Il n'existe cependant pas un recouvrement absolu et le contexte cellulaire/tissulaire semble aussi responsable de la spécificité de ces relations.

### 3-C-2-2- Inhibition de l'activité plateforme du récepteur

#### a- Par les PTPs

Elles peuvent intervenir en déphosphorylant des résidus tyrosine du domaine intracellulaire du récepteur, inhibant ainsi le recrutement des effecteurs de signalisation sur le récepteur

#### b- Par les protéines SOCS

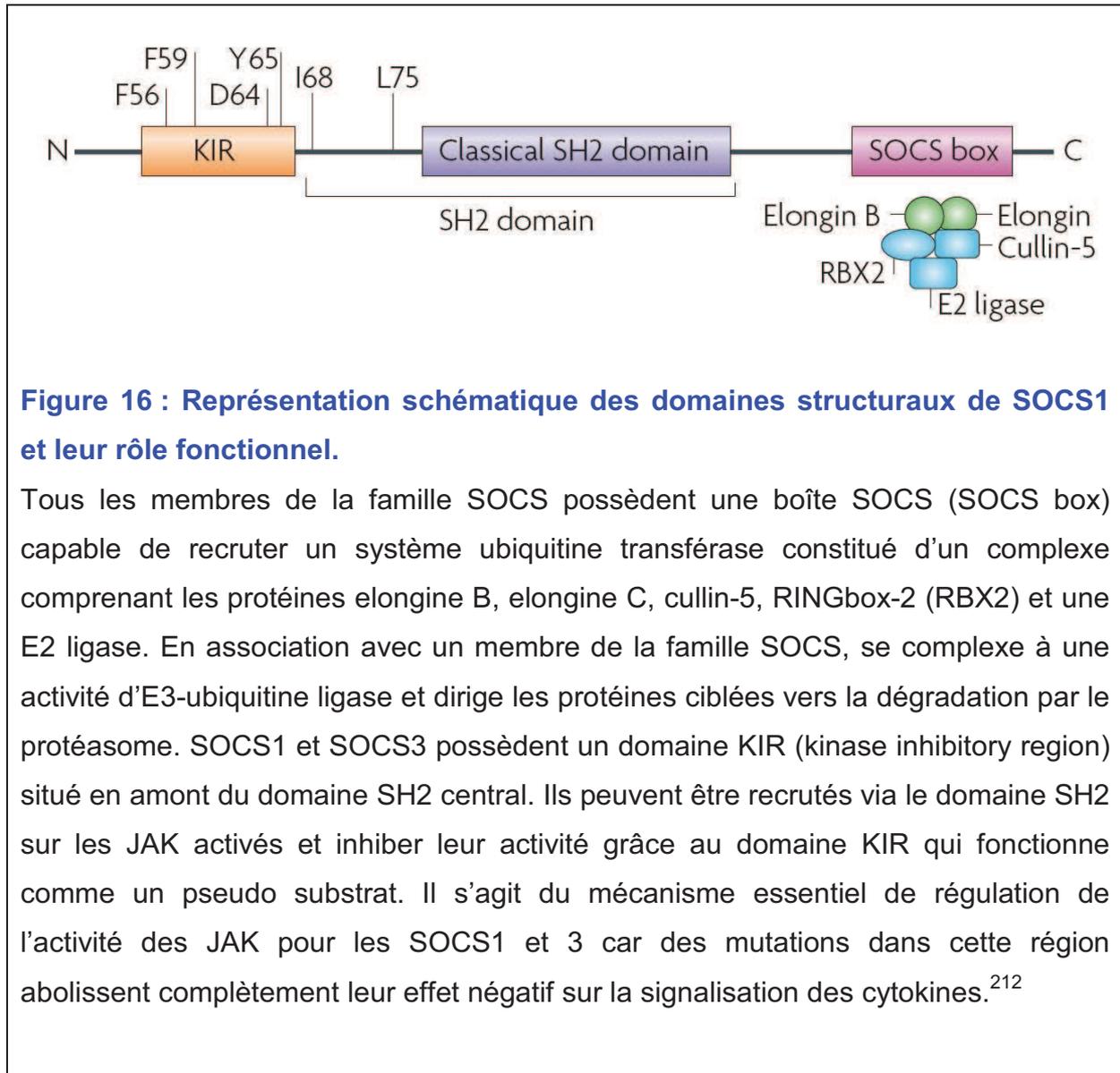
##### Généralités sur les SOCS

Les SOCS (Suppressor Of Cytokine Signaling) constituent une famille de 8 membres (SOCS 1-7 et CIS), bien connus pour leur rôle dans la régulation négative de la voie JAK/STAT. Les SOCS contiennent tous un domaine SH2 et une boîte SOCS (SOCS-box), ainsi qu'un domaine KIR dans le cas des SOCS1 et 3 ([figure 16, extraite de la référence <sup>210</sup>](#)). En bref, SOCS1 et SOCS3 sont capables d'inhiber l'activité kinase des JAK grâce à leur domaine KIR qui agit comme un pseudo substrat et à leur domaine SH2 par interaction avec la tyrosine catalytique.

*Pour un article de revue sur le sujet, consulter la référence <sup>211</sup>.*

##### Régulation de KIT par les SOCS

Dans les mastocytes, SOCS1 se lie à KIT (via son domaine SH2) ainsi qu'à d'autres effecteurs comme GRB2 et VAV (via son domaine SH3) après stimulation par le SCF. Il est vraisemblable que les SOCS n'agissent pas directement sur l'activité kinase du récepteur mais plutôt sur le recrutement et la phosphorylation d'autres interacteurs se comportant comme un compétiteur <sup>213</sup>.



**Figure 16 : Représentation schématique des domaines structuraux de SOCS1 et leur rôle fonctionnel.**

Tous les membres de la famille SOCS possèdent une boîte SOCS (SOCS box) capable de recruter un système ubiquitine transférase constitué d'un complexe comprenant les protéines elongine B, elongine C, cullin-5, RINGbox-2 (RBX2) et une E2 ligase. En association avec un membre de la famille SOCS, se complexe à une activité d'E3-ubiquitine ligase et dirige les protéines ciblées vers la dégradation par le protéasome. SOCS1 et SOCS3 possèdent un domaine KIR (kinase inhibitory region) situé en amont du domaine SH2 central. Ils peuvent être recrutés via le domaine SH2 sur les JAK activés et inhiber leur activité grâce au domaine KIR qui fonctionne comme un pseudo substrat. Il s'agit du mécanisme essentiel de régulation de l'activité des JAK pour les SOCS1 et 3 car des mutations dans cette région abolissent complètement leur effet négatif sur la signalisation des cytokines.<sup>212</sup>

### **3-C-3- Généralités sur la terminaison des signaux émanant des RTK: endocytose et dégradation des récepteurs**

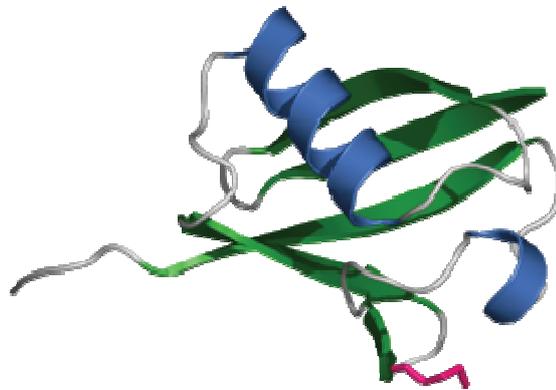
La fonction première de l'endocytose des récepteurs activés est de les soustraire de la surface membranaire afin que la cellule puisse répondre à une nouvelle stimulation. C'est cette fonction qui est abordée dans ce paragraphe. D'autre part, il est maintenant clair que le trafic intracellulaire des récepteurs activés sert d'autres fonctions, en particulier dans la régulation de la spécificité du signal. Ceci sera abordé au chapitre suivant.

### 3-C-3-1- Ubiquitine et ubiquitination

**L' Ubiquitination** est une cascade de réactions catalysées par trois classes d'enzymes E1, E2 et E3 conduisant à l'accrochage covalent d'une ubiquitine sur le groupement amine d'un résidu lysine d'une protéine substrat. **L'ubiquitine** (Ub) est une petite protéine de 76 résidus contenant 7 lysines ([Figure 17](#)). Sur les substrats, on distingue la mono-ubiquitination (ajout d'une seule ubiquitine) et la poly-ubiquitination qui résulte de l'enchaînement covalent de plusieurs molécules d'ubiquitine accrochées entre elles sur l'une des 7 lysines que compte chaque molécule. La topologie des chaînes d'ubiquitine est variable en fonction du résidu lys utilisé pour l'accrochage et cette topologie est responsable de réponses biologiques distinctes. Une chaîne d'au moins 4 ubiquitines liées en Lys48 est typiquement responsable de la dégradation de la protéine ciblée par le protéasome 26S, alors que la mono-ubiquitination intervient dans le trafic cellulaire et la réparation de l'ADN.

*Pour un article de revue sur le sujet, consulter la référence <sup>214</sup>.*

**Figure 17 : Représentation en ruban de la structure de l'ubiquitine**

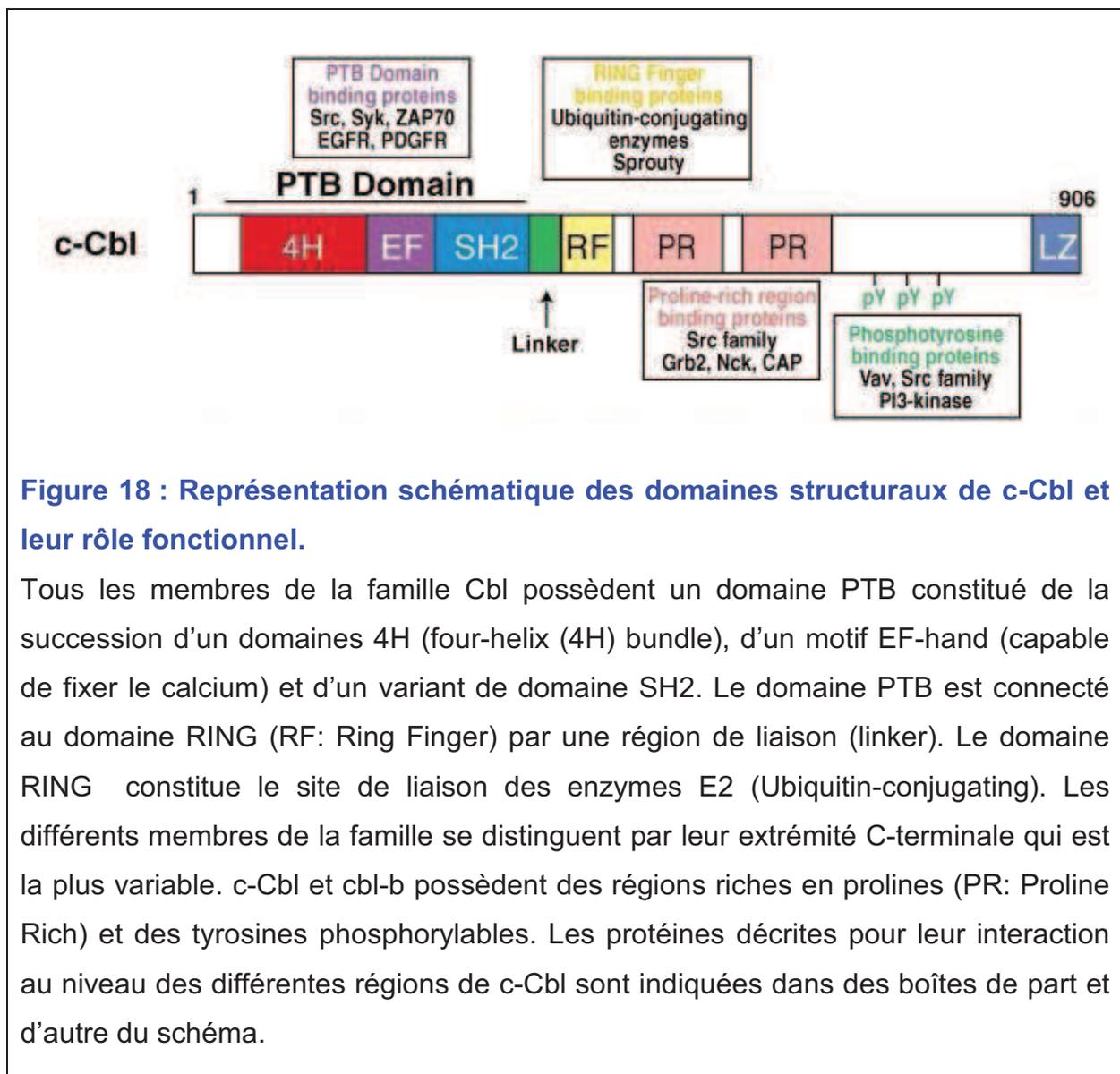


### 3-C-3-2- Cbl, une E3-ubiquitine ligase agissant sur les RTK

De nombreux RTK sont ubiquitinilés de manière dépendante du ligand par l'intermédiaire des membres de la **famille Cbl** (pour Casitas B-lineage Lymphoma). La famille Cbl comporte trois membres chez les mammifères c-Cbl, Cbl-b et Cbl-3. Les protéines Cbl sont des protéines modulaires qui contiennent (de N en C) un domaine TKB, un domaine de liaison, un domaine RING, des séquences polyproline

et un domaine UBA pour c-Cbl et Cbl-3 (figure 18). Ce sont des enzymes E3-ubiquitine ligase, mais elles peuvent aussi fonctionner comme des adaptateurs protéiques. c-Cbl par exemple est décrit comme interagissant avec plus de 40 partenaires. Elles interagissent directement avec les phosphotyrosines des RTK par leur domaine TKB (Tyrosine Kinase Binding domain, domaine unique à cette famille) ou sont recrutées indirectement par des adaptateurs comme GRB2 (le domaine SH3 de GRB2 interagit avec une séquence riche en proline en C-ter de Cbl). Le domaine RING permet le recrutement des enzymes E2 et porte l'activité ligase. Le domaine de liaison contient une tyrosine phosphorylable indispensable à l'activité ligase.

Pour un article de revue sur le sujet, consulter la référence <sup>215</sup>.



**Figure 18 : Représentation schématique des domaines structuraux de c-Cbl et leur rôle fonctionnel.**

Tous les membres de la famille Cbl possèdent un domaine PTB constitué de la succession d'un domaines 4H (four-helix (4H) bundle), d'un motif EF-hand (capable de fixer le calcium) et d'un variant de domaine SH2. Le domaine PTB est connecté au domaine RING (RF: Ring Finger) par une région de liaison (linker). Le domaine RING constitue le site de liaison des enzymes E2 (Ubiquitin-conjugating). Les différents membres de la famille se distinguent par leur extrémité C-terminale qui est la plus variable. c-Cbl et cbl-b possèdent des régions riches en prolines (PR: Proline Rich) et des tyrosines phosphorylables. Les protéines décrites pour leur interaction au niveau des différentes régions de c-Cbl sont indiquées dans des boîtes de part et d'autre du schéma.

Le recrutement d'une E2 chargée d'ubiquitine à proximité d'un récepteur activé et l'activation de Cbl par phosphorylation conduisent au transfert de l'ubiquitine sur le RTK. Dans le cas de EGFR et PDGFR, il s'agit d'une multi-ubiquitination (mono-ubiquitination sur plusieurs sites), parfois suivi de l'allongement des chaînes. Il semble qu'une mono-ubiquitination soit suffisante pour l'endocytose, et que la poly-ubiquitination puisse accélérer le processus dans le cas d'EGFR <sup>214</sup>.

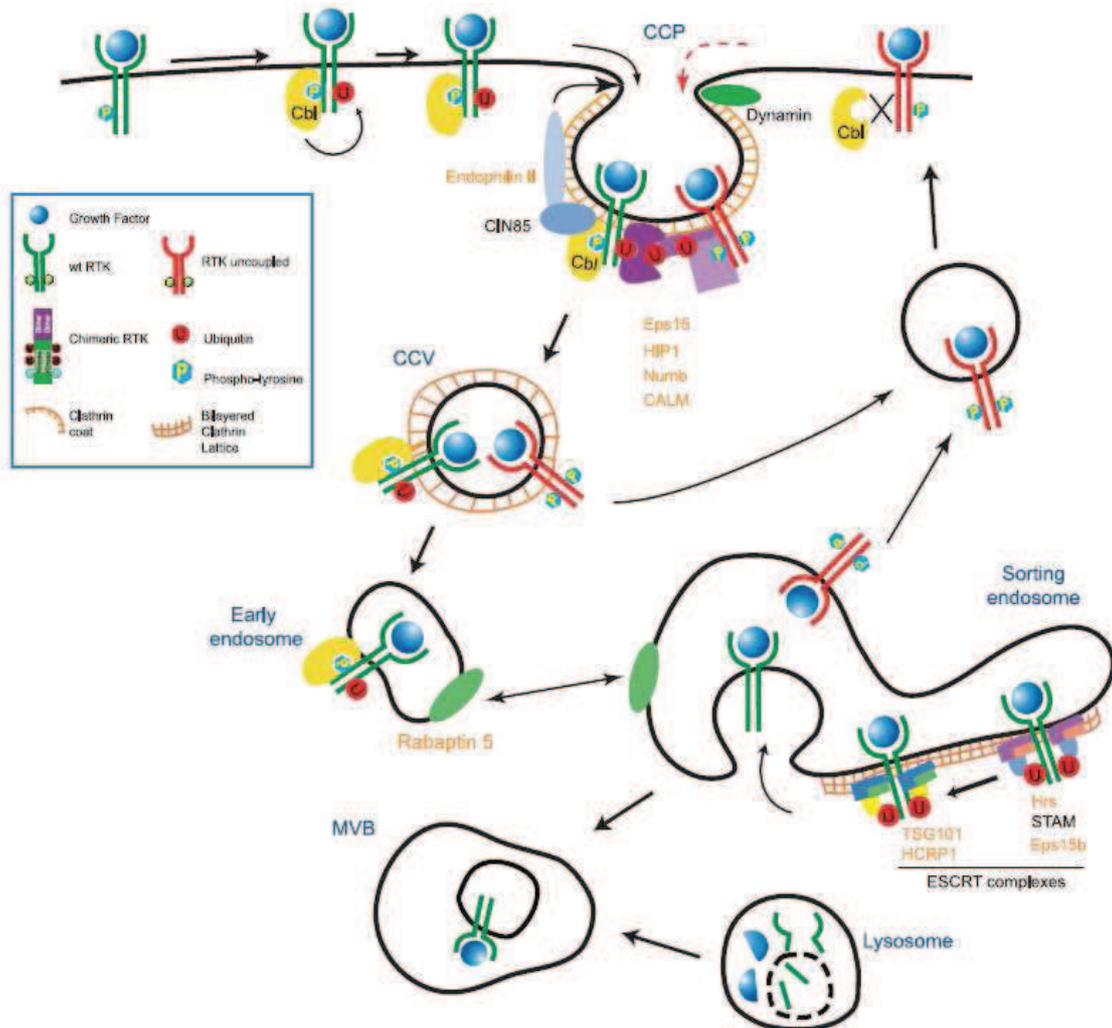
### 3-C-3-3- Endocytose clathrine-dépendante et dégradation des RTK

**L'endocytose** classique se fait au niveau des puits recouverts de clathrine « clathrin-coated pits » (CCPs). Le recrutement des complexes récepteurs/ligands dans les puits fait intervenir de nombreux complexes protéiques comme par exemple le complexe c-Cbl/CIN85/endophiline <sup>216</sup>. Les vésicules d'endocytose bourgeonnent à l'intérieur des cellules et après scission (catalysée par la dynamine) forment des vésicules (CCVs). Après avoir perdu leur manteau, elles fusionnent avec les endosomes. Ces endosomes précoces peuvent ensuite fusionner entre eux (sous contrôle des petites protéines G de la famille Rab) pour former des endosomes tardifs. Les corps multivésiculaires (MVBs) se forment par invagination de la membrane des endosomes tardifs et renferment les RTK. La formation des MVBs fait intervenir les protéines du « complexe de tri des endosomes requis pour le transport » (Endosomal Sorting Complex Required for Transport ESCRTs). Ce complexe est recruté par les mono-ubiquitine et/ou les chaînes de poly-ubiquitine K63 sur les RTK et orchestre leur internalisation dans les endosomes pour former les MVBs. Ceux-ci fusionnent finalement avec les lysosomes, conduisant à la protéolyse des RTK (figure 19). Il est à noter que dans certains cas le recyclage des récepteurs peut intervenir avant la formation des MVBs mais la régulation de ce phénomène est peu étudiée.

*Pour des articles de revue sur le sujet, consulter les références <sup>217 218</sup>.*

**Figure 19 : Schéma général de l'endocytose des RTK**

Suite à leur activation, les RTK sont phosphorylés et recrutent l'E3-ubiquitine ligase Cbl. L'ubiquitination des RTK (entre autres probablement) permet le recrutement des RTK dans les puits recouverts de clathrine (CCPs : clathrin-coated pits) (RTK en vert). Les CCPs bourgeonnent dans le cytoplasme pour devenir des vésicules recouvertes de clathrine (CCVs : clathrin-coated vesicles). Ces vésicules perdent leur manteau de clathrine et fusionnent avec les endosomes précoces, formant les endosomes de tri (sorting endosomes). A ce stade les RTK peuvent être recyclés vers la membrane (en particulier s'ils ne sont pas ubiquitinylés) ou continuer dans la voie endocytique. Les RTK ubiquitinylés sont reconnus par les protéines de la machinerie ESCRT (endosomal sorting complex required for transport) qui recrutent le RTK dans des lattices recouvertes de clathrine de l'endosome de tri. Ils sont alors internalisés vers le lumen, plus ou moins rapidement selon les récepteurs, permettant une signalisation du compartiment intracellulaire endosomal plus ou moins longue. Les endosomes remplis de vésicules contenant des RTK sont connus sous le nom de corps multi-vésiculaires (MVBs : MultiVesicular Bodies). Ils fusionnent avec les lysosomes, aboutissant à la destruction des constituants contenus dans leur lumen. Les protéines écrites en orange sont celles dont l'implication a été décrite dans des cancers humains.



### 3-C-4- Dégradation des RTK par le protéasome?

#### Rôle des SOCS et de la poly-ubiquitination des RTK

Comme mentionné précédemment, les membres de la famille SOCS contiennent un motif particulier appelé **boite SOCS** (SOCS-box). Cette boîte interagit avec un complexe elongineB-elongineC, lui-même liant des protéines de la famille culine, ces dernières interagissant avec une protéine de la famille Rbx. Ce complexe de type ECS (ElonginC-Culin-SOCSbox) a une activité d'E3-ubiquitine ligase. Les partenaires du domaine SH2 des SOCS peuvent ainsi être poly-ubiquitinylés et dirigés vers le protéasome 26S.

*Pour des articles de revue sur le sujet, consulter les références <sup>219</sup> et <sup>220</sup>.*

L'expression de SOCS5 augmente après stimulation de EGFR avec de l'EGF. SOCS5 est responsable d'une diminution de l'expression d'EGFR de manière dépendante des domaines SH2 et SOCS box. Cette diminution d'expression est liée à la dégradation d'EGFR de manière indépendante de Cbl et dépendante de l'activité E3 du complexe ECS recruté sur SOCS5. SOCS5 et EGFR interagissent directement via le domaine SH2 de SOCS après stimulation mais aussi avant stimulation via les domaines SH2 et N-ter de SOCS5 selon un mécanisme non élucidé. SOCS5 est impliqué dans la régulation de la demi-vie du récepteur avant et après stimulation <sup>221</sup> <sup>222</sup>. L'expression de SOCS5 diminue le pouvoir mitogénique de EGFR <sup>222</sup>.

Notre équipe a décrit l'interaction de KIT avec SOCS6 sur la tyrosine 567 et son implication dans la régulation négative du signal MAPK <sup>223</sup>. Ainsi SOCS6 pourrait intervenir dans la dégradation de KIT par le protéasome.

En résumé on peut dire que les **RTK peuvent être dégradés par les deux grands modes de dégradation protéique** qui existent dans la cellule que sont la **dégradation lysosomale** et la **dégradation utilisant le protéasome 26S**. Ces deux voies ne sont pas antagonistes et un lien a déjà été décrit entre les deux au niveau des endosomes <sup>224</sup>.

### **3-C-4-Terminaison de la signalisation intracellulaire activée par la voie SCF/KIT**

#### **3-4-1- Notions cinétiques**

Dans des mastocytes stimulés, la stimulation de KIT par le SCF conduit à une disparition rapide du récepteur de la surface cellulaire (selon une loi cinétique du 1<sup>er</sup> ordre) <sup>198</sup>. Au bout d'environ 30min de stimulation, le pourcentage de récepteurs restants en surface est réduit d'au moins 50% <sup>198</sup>, minimale en 24h <sup>225</sup>. Cette disparition est liée à l'internalisation du récepteur qui reste couplé au SCF <sup>198</sup> et qui apparaît dans des structures intracellulaires ponctiformes compatibles avec des vésicules <sup>226 227</sup>. Elle s'accompagne d'une dégradation du récepteur qui n'est plus détectable du tout après une heure de stimulation <sup>225</sup>. En l'absence de SCF, le temps de demi-vie de KIT est de une à deux heures, et de 30 minutes après stimulation. La ré-apparition du récepteur en surface suit une cinétique beaucoup plus lente, et il faut plus de 48h pour retrouver le niveau de base <sup>225</sup>. Le récepteur n'est pas recyclé et la réapparition est entièrement dépendante de la néosynthèse de nouveaux messagers et de leur traduction. <sup>225 226 227</sup>.

#### **3-4-2- Notions mécanistiques**

**L'activité kinase du récepteur est requise pour l'internalisation** <sup>198 227</sup>. De l'étude des mutants Y719F et Y568-570F, il est suggéré que la voie PI3K n'est pas impliquée dans l'internalisation, mais que la voie SRC l'est (diminution notable du nombre de vésicules) <sup>198,227,228</sup>. Les SFK semblent effectivement impliquées dans l'internalisation car des cellules déficientes pour *lyn* présentent une internalisation réduite <sup>181</sup> et le même effet est observé avec un traitement au SU6656 <sup>229</sup>. Les SFK seraient impliquées dans la phosphorylation de Cbl mais ces démonstrations ont été obtenues en étudiant le mutant Y568-570F et sont donc à prendre avec précautions <sup>230 229</sup>.

**Cbl intervient dans le processus d'endocytose/dégradation de KIT.** Cbl-b et c-Cbl s'associent à KIT et sont phosphorylées suite à son activation<sup>230</sup>. Les membres de la famille Cbl pourraient être recrutés sur KIT indirectement via APS<sup>136</sup><sup>231</sup> ou GRB2<sup>232</sup><sup>233</sup>. Une interaction directe dépendante de la phosphorylation de KIT est décrite sur les tyrosines 568 et 936 (hKIT). La spécificité de l'interaction est dictée par un résidu hydrophobe ile/leu en +3 des tyrosines<sup>229</sup>. Le recrutement de Cbl sur KIT et la phosphorylation successive sont des phénomènes nécessaires à l'ubiquitination du récepteur et à son internalisation qui conduit à une dégradation lysosomiale du récepteur<sup>229</sup>.

KIT est poly-ubiquitinilé suite à son activation<sup>234</sup><sup>198</sup><sup>230</sup>. Les outils récents permettant de discriminer les différentes formes d'ubiquitination ont permis à Masson et al de conclure plutôt à une mono ubiquitination du récepteur<sup>229</sup>.

Des expériences de co-immunoprécipitation<sup>228</sup> et de visualisation par imagerie confocale d'une construction chimère c-kit-EGFP (SS-EYFP-KIT) suggèrent que la stimulation de KIT s'accompagne de sa localisation dans les CCPs. Par ailleurs l'intégrité et la fonctionnalité des RAFT est un pré requis à son internalisation<sup>227</sup>.

### **3-D- Les facteurs déterminants la spécificité de la signalisation intracellulaire activée par les RTK**

Les études initiales dans le domaine de la signalisation intracellulaire activée par les RTK ont tenté de répondre à **deux questions centrales** : Des récepteurs différents activent-ils des voies différentes ? Existe-t-il une spécificité de certaines voies de signalisation pour certaines fonctions cellulaires ?

Ces études ont conduit à la découverte de la redondance de la signalisation tant au niveau de l'activation des voies par les récepteurs que dans les effets de ces voies.

Dans les années 95, des expériences majeures permettent de réconcilier redondance et spécificité en démontrant l'importance du codage quantitatif du signal. Une série d'études montrent en effet que, plus que la nature des récepteurs, la **cinétique d'activation d'une voie** intracellulaire donnée peut produire des effets biologiques différents<sup>235</sup>.

Plus tard on découvre que la cellule est un environnement non homogène dans lequel la **localisation des voies** de signalisation peut elle aussi influencer la nature des réponses biologiques.

Aujourd'hui on sait que tous les RTK utilisent le même réseau de signalisation intracellulaire et que pour un RTK donné, il n'existe pas de voie spécifique ou de gènes spécifiques responsables d'une réponse biologique donnée. **La spécificité provient du codage spatio-temporel de la signalisation intracellulaire** activée suite à une stimulation ou suite à l'intégration et au traitement de plusieurs stimulations.

L'objectif de ce paragraphe est d'illustrer par quelques exemples les mécanismes moléculaires pouvant rendre compte du codage spatio-temporel de la signalisation permettant d'expliquer la spécificité des réponses biologiques.

Pour cela nous présentons l'évolution des découvertes expérimentales ayant permis de faire évoluer les concepts dans le domaine de la signalisation intracellulaire. Nous évoquons aussi les données récentes faisant état des connaissances actuelles sur les mécanismes assurant la spécificité de la signalisation à l'échelle d'un récepteur donné puis à l'échelle de la cellule.

### **3-D-1- La redondance et ses limites**

*Ce paragraphe est en partie le fruit de l'analyse de l'article de revue « Accounting for specificity in receptor tyrosine kinase signaling »<sup>236</sup> dont les figures sont extraites.*

#### **3-D-1-1- Redondance de l'activation des voies au niveau du récepteur**

Ayant été établi que les RTK pouvaient activer différentes voies de signalisation intracellulaire à partir du recrutement spécifique de composants de ces voies sur différentes tyrosines phosphorylées de leur domaine intracellulaire, la question de la **spécificité des voies pour une fonction** a été explorée à l'aide de **mutants ponctuels de tyrosines intracellulaires**.

De manière générale ces études ont révélé que la **substitution d'une unique tyrosine n'était pas suffisante pour compromettre une fonction cellulaire**, suggérant l'existence soit de voies parallèles agissant sur la même fonction soit de mécanismes redondants dans l'activation des voies au niveau du récepteur.

Les études biochimiques successives ont montré que la délétion d'un site n'était pas suffisante à l'abolition d'une voie en raison de l'existence de **plusieurs routes convergentes pour l'activation d'une même voie** et ce au niveau du récepteur lui-même (Figure 20A). Par exemple, il existe pour tous les RTK de multiples moyens d'activer la voie MAPK-ERK. L'activation peut être directe via le recrutement du complexe GRB2-SOS ou indirecte via le recrutement d'adaptateurs recrutant GRB2-SOS (par exemple SHC, SHP-2...). Par ailleurs les RTK phosphorylent des protéines d'ancrages pouvant elles-mêmes jouer des rôles identiques dans le recrutement et l'activation de la voie ERK (se référer au [paragraphe 3-B-2-3-b](#) dans le cas de KIT).

Différents modèles de spécificité de la signalisation RTK sont représentés dans les [figures 20 \(extraites de <sup>236</sup>\)](#). Les schémas montrent un RTK générique, capable d'activer trois voies de signalisation A, B et C. X, Y et Z représentent trois réponses biologiques enclenchées par ces voies.

**Figure 20A : Redondance dans l'activation des voies par le récepteur**

L'activation des différentes voies par le récepteur est redondante, c'est-à-dire que l'activation d'une voie est suffisante à elle seule pour induire l'intégralité des réponses biologiques (que les effets des voies soient eux-mêmes redondants (à droite) ou non (à gauche)).



Ainsi, si les voies ont des effets sélectifs, cette spécificité ne provient pas de leur activation spécifique au niveau d'une tyrosine d'un RTK. Ces observations permettent de suggérer par ailleurs que la **sélectivité ne serait pas issue de modifications qualitatives de phosphorylation des RTK.**

### 3-D-1-2- Redondance transcriptionnelle des voies au niveau génique

Une des conséquences de la signalisation intracellulaire est l'activation ou la répression d'un certain nombre de gènes dont la transcription/traduction est en partie responsable de la réponse biologique adaptée au signal perçu.

La question de la **spécificité des voies pour une fonction** a par la suite été appréhendée **au niveau génique**. Des études ont été menées afin de déterminer si chaque voie de signalisation intracellulaire affectait spécifiquement un pool de gènes donné.

Dans une étude pionnière, Fambrough et *al* ont analysé l'activation des gènes précoces (IEG : Immediate Early Genes) sous différents mutants des tyrosines intracellulaires de PDGFR $\beta$  dans des fibroblastes NIH3T3. Il s'agit d'une des

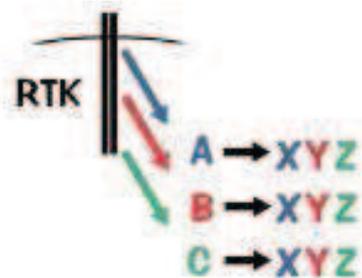
premières études transcriptomique à large échelle utilisant des puces couvrant l'expression de plus de 5000 gènes. Les résultats obtenus suggèrent que **la majorité des voies ont le même effet transcriptionnel**, cet effet étant finalement comparable à celui obtenu par la stimulation d'un autre RTK dans le système, ici EGFR<sup>237</sup>. *Cet article est commenté dans une « minireview » de Tony Pawson<sup>238</sup>.*

De façon général, cette étude suggère que les RTK activent des voies différentes qui convergent et ont le même effet sur les gènes précoces. Les voies auraient un effet transcriptionnel redondant et il existerait donc une compensation possible entre différentes voies. La redondance de l'effet transcriptionnel des voies peut être schématisée comme le montre la [figure 20B](#).

Le résultat de cette étude est assez provocateur mais, en dehors des limites de l'étude qui seront discutées plus loin, elle suggère que les RTK sont responsables d'une **réponse transcriptionnelle générique**. Ceci laisse entendre que **la spécificité proviendrait de modifications quantitatives plutôt que qualitatives**.

**Figure 20B : Redondance dans de l'effet transcriptionnel des voies**

Les voies ont des effets redondants, c'est-à-dire que toutes sont capables d'activer les mêmes réponses biologiques.



**Ainsi, il existe une redondance des mécanismes d'activation des voies de signalisation intracellulaires au niveau des récepteurs et d'autre part les voies elles-mêmes ont globalement des effets transcriptionnels redondants.**

### 3-D-1-3- Les limites de la redondance : vers la spécificité

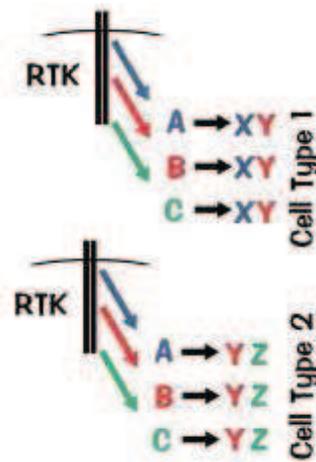
#### a- De l'étude des modèles cellulaires

**La spécificité existe à l'échelle cellulaire.** Beaucoup d'études ont montré qu'un même RTK peut avoir des effets biologiques différents en fonction de la cellule dans laquelle il est activé. Par exemple, la stimulation de FGFR induit la différenciation des cellules PC12 alors qu'il induit la prolifération des fibroblastes<sup>239</sup>  
240

Dans une vision extrême où ni les RTK ni les voies intracellulaires ne sont responsables de la spécificité de la réponse, les RTK ne font que convoier une information qui conduit à l'activation de facteurs de transcription et à **l'expression d'un pool de gènes spécifiques à un type cellulaire donné**, dépendant de **l'histoire cellulaire**, celui-ci définissant ultimement la réponse biologique (Figure 20C).

**Figure 20C : Spécificité cellulaire**

Les voies ont des effets redondants (idem 20B) mais les effets biologiques possibles varient en fonction du type cellulaire. Ici « X » et « Z » sont spécifiques des cellules de type 1 ou 2 respectivement, tandis que « Y » est une réponse commune.



Une **avancée conceptuelle majeure** a été réalisée par l'étude des différences de signalisations intracellulaires impliquées dans la prolifération ou la différenciation des cellules PC12. Ces données expérimentales sont résumées dans une revue bibliographique de Chris Marshall<sup>235</sup>. La recherche de voies sélectivement activées au cours de l'un ou l'autre des phénomènes biologiques a été largement infructueuse, par contre les études ont révélé une **différence quantitative majeure dans l'activation de la voie MAPK-ERK**. Dans les cellules PC12, l'**activation**

**prolongée** de la voie ERK sous stimulation NGF induit la différenciation, tandis qu'une **activation transitoire** sous stimulation EGF est impliquée dans la prolifération.

D'autres études rapportent ce même phénomène.

L'activation transitoire de ERK par EGF induit la prolifération des cellules MCF-7 alors que l'activation prolongée par l'héreguline induit la différenciation<sup>241</sup>.

Dans la lignée UT-7/GM, il est possible d'induire une différenciation érythroïde avec une stimulation à l'Epo ou une différenciation mégakaryocytaire sous TPO. Une étude suggère que les deux stimulations activent la voie ERK mais de manière transitoire dans le cas de l'Epo et prolongée dans le cas du TPO<sup>166</sup>.

Ces stimulations différentielles sont obtenues par la stimulation de différents récepteurs. Mais ce concept s'applique aussi aux différentes réponses biologiques produites par un même récepteur ([voir paragraphe 3-D-2-2-a](#)).

Si l'on revient sur l'étude de l'effet transcriptionnel des voies, réalisée par l'équipe de Fambrough<sup>237</sup>, on constate que l'un des écueils de l'étude était effectivement la stimulation à quantité saturante et constante de ligand.

## **b- De l'étude des modèles animaux**

L'étude des modèles **animaux knocked-in** de tyrosines spécifiques a révélé d'importantes **limites à la redondance, tant à l'échelle cellulaire qu'à l'échelle des voies**. Des mutations de tyrosines différentes d'un même récepteur conduisent à des phénotypes différents suggérant l'implication spécifique de certaines voies dans certaines fonctions. D'autre part pour un même mutant, certains compartiments cellulaires sont affectés et d'autres pas, suggérant une limite cellulaire à la complémentation.

Par exemple, la souris transgénique knocked-in de la tyrosine 719 de mKIT (site de la fixation de la PI3K) présente un déficit dans la gamétogenèse. Le phénotype est très spécifique au compartiment des PGCs<sup>144</sup>. Ceci suggère soit que

la voie PI3K n'est pas indispensable dans le développement des autres compartiments KIT-dépendants tels que les mélanocytes ou le compartiment érythroïde, soit qu'une complémentation fonctionnelle a eu lieu dans ces compartiments et pas dans les PGCs. Par comparaison, la souris transgénique knocked-in des tyrosines 567-569 de mKIT n'a pas de défaut dans le compartiment des PGCs <sup>145</sup>.

### 3-D-1-4- La signalisation : un ballet dans l'espace et le temps

Les expériences pionnières dans les cellules PC12 ont révélé qu'une différence quantitative dans l'activation de la voie ERK (intensité et cinétique) est à l'origine de deux processus biologiques différents. **Deux des hypothèses** pouvant expliquer une différence quantitative d'activation de la voie ERK sont (i) des différences qualitatives d'activation des récepteurs eux-mêmes, ou (ii) l'usage différentiel de différents modules convergents sur l'activation de la voie (ici indépendamment du contexte cellulaire).

La **première hypothèse** pourrait se traduire par des modifications quantitatives du **nombre et de la demie vie des récepteurs activés**.

La **deuxième hypothèse** pourrait être expliquée par des **modifications qualitatives des tyrosines phosphorylées** ou par l'existence d'une **ségrégation spatiale des différents modules de signalisation**.

Ces deux hypothèses ne sont pas mutuellement exclusives et la spécificité de la signalisation intracellulaire semble provenir de l'utilisation de tous ces mécanismes à la fois. Il est maintenant reconnu que la spécificité provient du **codage spatiotemporel de l'information** transmise via les réseaux de signalisations intracellulaires. Ces réseaux sont globalement identiques dans les cellules, à condition de ne pas tenir compte de l'histoire cellulaire dont l'importance sera évoquée plus tard ([paragraphe 3-D-5-3](#)). L'**intensité** (amplitude), la **durée** et la **localisation** du signal sont autant de paramètres fondamentaux dans la décision de la réponse biologique.

Les paragraphes suivants sont consacrés à la description détaillée d'exemples et de mécanismes pouvant rendre compte de cette spécificité via la modulation de ces trois paramètres. Dans un souci de clarté, ils sont présentés autant que possible de manière indépendante. La réalité est bien plus complexe et certains mécanismes agissent sur un ou plusieurs des paramètres à la fois.

### **3-D-2- Amplitude initiale de la signalisation**

#### **Intégration à l'échelle du récepteur**

Les RTK sont activés suite à la liaison de leur ligand. La concentration des ligands varie de manière quantitative et continue, définissant une information de nature analogique.

Dans ce paragraphe nous verrons comment l'amplitude initiale du signal intracellulaire provient de l'encodage au niveau du récepteur de l'intensité initiale de la stimulation, c'est-à-dire de la transduction de l'information contenue dans le ligand.

#### **3-D-2-1- Nature du signal ligand**

Les facteurs de croissance sont des médiateurs chimiques qui agissent sur les cellules cibles. **A un temps donné**, le signal porté par les médiateurs chimiques est codé en terme de concentration, ce qui **spatialement** se traduit par la présence d'un gradient. Si le gradient est nul, la concentration est uniforme, sinon il existe une distribution non homogène du ligand et des cellules situées en différents points sont soumises à différentes concentrations du ligand. **A un endroit donné**, le signal est codé en fréquence. Une cellule soumise de manière alternée à la présence ou l'absence de ligand est sous stimulation transitoire alors qu'une cellule soumise à la présence permanente du ligand est sous stimulation chronique.

**Le signal ligand est donc vecteur d'informations spatiotemporelles pour les cellules qui le reçoivent.**

Dans le **cas de KIT**, le SCF existe sous forme soluble mais aussi sous forme membranaire. La stimulation par les formes membranaires est une stimulation chronique pour les cellules cibles sauf lorsque des mécanismes régulent le taux d'expression des deux formes comme précédemment mentionné pour le cycle de stimulation des PGCs par les cellules de Sertoli ([paragraphe 2-4-2](#)). L'existence de ces deux formes de SCF ajoute un niveau élevé de complexité dans l'intégration de la stimulation par le récepteur KIT.

### 3-D-2-2- Encodage de l'intensité du signal ligand au niveau du récepteur

La réponse du récepteur à la stimulation est une réponse tout ou rien (binaire) de part et d'autre d'un **seuil de stimulation**. Mais une fois le seuil de déclenchement de la réponse dépassé, l'intensité de stimulation est convertie en une réponse gradée (analogique) par le récepteur. Ceci peut amener des effets biologiques différents.

#### **a- Exemples de réponses dose dépendantes des RTK**

Dans le cas de KIT, il n'existe pas d'études illustrant des réponses différentielles en fonction d'une stimulation variable de ligand. Cependant des éléments de réponse peuvent être obtenus de l'analyse de cette question dans d'autres systèmes. L'exemple du récepteur PDGFR, qui appartient à la même famille que KIT, est détaillé ici.

Dans des fibroblastes NIH3T3, la stimulation de PDGFR par son ligand est capable d'induire deux effets biologiques différents que sont la prolifération et la migration cellulaire.

Une concentration élevée de PDGF est requise pour induire l'entrée en phase S des cellules, tandis qu'à des doses plus faibles les cellules ont tendance à migrer plus efficacement. Il semble que l'augmentation de la concentration en PDGF induise une transition entre un phénotype migratoire et un phénotype prolifératif <sup>242</sup>

**La dose de ligand influence donc la réponse biologique.**

Dans cet exemple, la relevance biologique des deux phénomènes apparaît assez clairement. Des gradients de facteurs de croissance existent dans des conditions physiologiques tel qu'au cours du développement par exemple, et dans des conditions pathologiques comme durant la réparation tissulaire, l'angiogenèse et la croissance tumorale. On pourrait imaginer que les cellules capables de répondre au gradient, c'est-à-dire possédant le récepteur adéquat, lorsqu'elles sont distantes du site de production, perçoivent une quantité faible de ligand et répondent alors par une migration vers le site de production, et, une fois sur place, le signal est d'intensité plus forte et les cellules entrent alors en division.

**Par quel mécanisme le récepteur réalise-t-il l'intégration différentielle de différentes concentrations de ligand ?** Les auteurs de cette étude <sup>242</sup> proposent deux hypothèses.

Il pourrait s'agir d'**une différence qualitative** de phosphorylation du récepteur lui-même. Il existerait différents pools de tyrosines phosphorylables, capables d'activer spécifiquement certaines voies de signalisation.

Cette hypothèse est écartée dans leur étude à l'aide d'expériences utilisant des anticorps phospho-spécifiques dirigés contre les tyrosines intracellulaires.

Même si cette technique possède de nombreuses limitations, aucune autre étude plus récente ne permet d'appuyer l'hypothèse d'une différence qualitative de phosphorylation d'un RTK.

La deuxième hypothèse est **une différence quantitative**. La phosphorylation du récepteur est un phénomène tout ou rien mais il peut exister des variations importantes du nombre de récepteurs phosphorylés et de leur demie vie.

**Comment l'intensité du signal ligand est-elle convertie en modulations quantitatives d'activation des récepteurs (ie nombre et demie vie) ?**

## **b- Activation, Ubiquitination et Internalisation des RTK**

Suite à leur activation, les RTK sont internalisés. **Plusieurs voies d'internalisation des RTK sont décrites.** La voie conventionnelle est la voie d'endocytose dépendante de la clathrine (CME : clathrin-mediated endocytosis), mais il existe aussi des voies indépendantes de la clathrine (dites NCD : non clathrin-dependant). L'une d'entre elles a lieu au niveau de microdomaines lipidiques membranaires appelés « caveolae ». Les cavéoles sont apparentées aux lipides raft et la voie d'endocytose est dite voie dépendante des raft (RME : raft-mediated endocytosis).

*Pour un article de revue sur l'endocytose non conventionnelle, consulter la référence 243*

Dans l'étude sur PDGFR, De Donatis et *al* ont constaté une corrélation entre la dose de stimulation et la quantité de récepteurs internalisés. Ils ont regardé l'implication des voies d'internalisation CME et NCD (RME) en fonction de l'intensité de la stimulation.

Les résultats suggèrent qu'à faible dose de ligand, le récepteur est majoritairement internalisé par CME alors qu'à forte dose, la RME est prépondérante.

**La dose de ligand influence donc la demie vie des RTK activés et ce en partie par l'utilisation de voies d'internalisation différentes.**

**Par quel mécanisme l'intensité de signalisation est-elle convertie en une internalisation différentielle ?**

L'internalisation de EGFR emprunte elle aussi deux voies en fonction de la concentration du ligand EGF. A faible dose, le récepteur est internalisé exclusivement par CME tandis qu'à plus forte dose, l'internalisation résulte à la fois de la CME et de la RME. L'apparition de la RME coïncide avec l'apparition de l'ubiquitination du récepteur. L'étude de Sigismund et *al* suggère que le choix du mécanisme d'internalisation est fonction du taux d'ubiquitination du récepteur, lui-même fonction de la concentration en ligand <sup>244</sup>.

Biochimiquement parlant, il existe une corrélation entre le taux d'ubiquitination du récepteur et la concentration du ligand qui suit une courbe sigmoïde

caractéristique d'un mécanisme coopératif. Ce mécanisme coopératif définit un seuil d'ubiquitination d'EGFR et peut s'expliquer par l'existence de mécanismes directs et indirects de recrutement de Cbl sur le récepteur<sup>245</sup>.

Il est à noter que cette découverte a permis de réconcilier de nombreuses données apparemment contradictoires sur la question de l'ubiquitination comme processus nécessaire et/ou suffisant pour l'internalisation d'EGFR.

*Pour un article de revue sur le sujet, consulter la référence<sup>245</sup>.*

### **L'endocytose différentielle des récepteurs peut elle être impliquée dans des réponses biologiques différentes ?**

#### **Et si oui comment ? cf endosomes**

De Donatis et al ont analysés l'implication fonctionnelle des deux voies d'internalisation CME et NCD (RME) en les perturbant.

Les résultats montrent que (i) à faible dose de ligand, l'inhibition de la CME diminue les capacités migratoires des cellules, tandis que (ii) à forte dose de ligand, l'interférence avec la RME diminue la prolifération des cellules tandis que l'inhibition de la CME l'augmente fortement.

Dans le cas d'EGFR, les deux voies ne sont pas non plus fonctionnellement équivalentes.

L'équipe de Sigismund a pu montrer que la CME n'entraîne pas la dégradation du récepteur mais plutôt son recyclage à la membrane, tandis que la RME dirige les récepteurs vers les lysosomes. Par ailleurs, la CME favorise une durée prolongée d'activité de certaines voies telles que les voies MAPK-ERK et AKT et est nécessaire à la fonction mitogénique d'EGFR. Dans les deux cas d'endocytose, EGFR transite via les endosomes<sup>246</sup>.

#### **Des voies d'endocytose différentes peuvent donc entraîner des effets cellulaires distincts.**

Ainsi, **l'un des mécanismes d'intégration de l'intensité de la stimulation par le ligand est une endocytose différentielle des récepteurs activés** qui semble en partie dépendante du taux d'ubiquitination des récepteurs. Cette endocytose différentielle a des conséquences majeures sur (i) la demie vie des

récepteurs activés et sur (ii) la signalisation intracellulaire activée en aval. En effet des voies d'endocytose différentes sont capables de produire des effets cellulaires distincts, et ce en liaison avec la localisation de la signalisation. Il existe ici un couplage entre le codage spatial et le codage temporel qui sera discuté au [paragraphe 3-D-4-2-a](#).

Il est à noter que les conséquences de la CME et de la RME en terme de recyclage ou de dégradation des récepteurs varient en fonction du RTK considéré. Par exemple EGFR utilise la CME pour être recyclée et induire une stimulation prolongée de la voie ERK, à l'instar de TGF- $\beta$ R<sup>247</sup> <sup>248</sup>. A l'inverse, PDGFR<sup>242</sup> et Wnt3a<sup>249</sup> sont dégradés suite à leur internalisation via la CME et la signalisation prolongée a lieu via la RME.

Les fonctions des voies d'endocytose seraient donc interchangeables en fonction du RTK ou du type cellulaire considéré. Pour l'instant, il n'existe pas de règle universelle. *Pour un commentaire sur le sujet, consulter la référence*<sup>250</sup>.

Dans tous les cas, le point de rencontre de ces voies, par où transitent tous les RTK quelque soit leur devenir, est le compartiment intracellulaire constitué des endosomes. C'est sans doute au niveau de ce compartiment qu'est prise la décision du recyclage ou de la dégradation et il apparaît que l'ubiquitine ait un rôle majeur à jouer dans ce déterminisme.

*Pour un article de revue sur le sujet, consulter la référence*<sup>245</sup>.

Comme les endosomes sont non seulement impliquées dans le recyclage/dégradation mais sont aussi le lieu d'une signalisation intense (discuté dans la partie suivante), des mécanismes de régulations extrêmement complexes doivent s'y exercer.

L'endocytose n'est plus considérée comme un simple mécanisme de terminaison de la signalisation mais comme faisant partie intégrante de la signalisation. L'endocytose délivre les molécules de signalisation dans des compartiments intracellulaires dont le trafic est hautement régulé. L'encodage de l'intensité de stimulation est couplé à un codage spatial via l'endocytose et le rôle de la signalisation issue des endosomes sera discuté au paragraphe suivant.

### **c- Retour sur les spécificités biologiques des formes solubles et membranaires du SCF**

Comme mentionné au [paragraphe 2-A-3](#), les formes solubles et membranaires du SCF exercent certains effets biologiques distincts qui ne peuvent être mutuellement compensés *in vivo*, en particulier dans les compartiments hématopoïétiques et les PGCs<sup>99 251</sup>.

Ces effets différentiels ont été étudiés *in vitro* dans l'hématopoïèse.

Une étude a comparé la capacité de cellules stromales exprimant du SCF soluble ou du SCF membranaire à soutenir la croissance de HCS et de progéniteurs humaines. Pour ce faire, des cellules stromales du foie foetal de souris *Sl* (qui n'expriment pas le SCF) ont été transfectées soit avec du SCF 248 (le clivage protéolytique conduit à la forme soluble) soit avec du SCF 220 membranaire humain. L'étude montre que la croissance de HCS et progéniteurs est maintenue plus longtemps avec la forme membranaire qu'avec la forme soluble<sup>252</sup>.

Sur le plan biochimique, la stimulation de KIT par le SCF membranaire s'accompagne d'une durée d'activation et d'un temps de demie vie du récepteur plus longs que lorsque le récepteur est stimulé par du SCF soluble, qui entraîne une dégradation plus rapide du récepteur<sup>253</sup>.

De la même manière dans le compartiment des PGCs ([confer paragraphe 2-A-2](#)), il existe une excellente corrélation entre les périodes cycliques de divisions des PGCs et l'expression préférentielle du SCF membranaire par rapport au SCF soluble<sup>43</sup>.

Ces résultats sont réminiscent des données présentées au dessus suggérant que le niveau d'activation du récepteur puisse avoir des conséquences différentes en terme d'endocytose et de signalisation intracellulaire pouvant affecter la réponse biologique.

Dans le cas de la stimulation de KIT par du SCF membranaire, la question de l'endocytose du récepteur reste d'ailleurs entière.

Enfin, si la stimulation de KIT par le SCF soluble peut a priori se faire sur toute la surface cellulaire, la stimulation par le SCF membranaire doit être focale. La stimulation pourrait s'accompagner de la formation d'une synapse au point de contact entre les deux types cellulaires, comparable à une synapse immunologique.

### **3-D-3- Cinétique de la signalisation émise par un récepteur**

#### **Rôle des phosphatases**

Des effets biologiques différents résultent d'un codage spatiotemporel différent du signal intracellulaire. Chaque signal doit donc être transmis avec une intensité spécifique durant un **laps de temps donné**. **Les mécanismes d'atténuation de la signalisation assurent le codage temporel de l'information.**

Dans le cas de la signalisation cellulaire transmise par les phosphorylations sur tyrosine, l'activation et l'atténuation du signal le long des voies résultent de **l'équilibre entre l'activité des tyrosine kinases et des tyrosine phosphatases (PTP).**

**Les modélisations mathématiques suivies d'expériences de validation suggèrent que les kinases sont majoritairement responsables de l'amplitude du signal tandis que les phosphatases sont plutôt impliquées dans le codage temporel du signal (durée et/ou fréquence)** <sup>254 255</sup>.

On sait depuis longtemps que les phosphatases atténuent le signal issu des kinases mais l'action des PTP a longtemps été considérée comme une **action passive, non sélective** et ce n'est que depuis peu que l'on considère leur rôle actif dans le contrôle de la signalisation. Les tyrosine phosphatases qui sont aussi nombreuses que les tyrosine kinases, présentent des structures extrêmement variées et plusieurs mécanismes assurent la régulation de leur activation et donc la spécificité de leur action. La famille des PTPs et leur mode d'action sur les RTK (action sur tyrosines du site catalytique ou sur les sites d'ancrage) ont déjà été présentés au [paragraphe 3-C-2-1-b](#). L'objectif de ce paragraphe est de mettre en évidence quelques uns des nombreux mécanismes de régulation de l'activité des PTPs qui démontrent leur rôle actif dans la signalisation.

Il est à noter que certaines phosphatases comme SHP-2 agissent en **amplifiant le signal** des RTK mais ce point n'est pas l'objet de ce paragraphe et ne sera pas détaillé.

### 3-D-3-1- Spécificité catalytique des PTPs

L'étude des **souris knocked-out** pour différentes PTPs a révélé une certaine spécificité des PTPs pour différents RTK. Il ne s'agit ni d'une sélectivité absolue ni d'une promiscuité générale.

*Pour un article de revue sur le sujet, consulter la référence <sup>256</sup>.*

Comme pour les kinases, des tests d'activité *in vitro* révèlent l'existence de motifs substrats préférentiels des PTPs <sup>257</sup>.

### 3-D-3-2- Régulation de l'activité catalytique des PTPs

#### **a- Oxydation**

L'oxydation de la cystéine du site actif des PTPs par le peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) régule négativement leur activité <sup>258</sup>. De manière très intéressante, l'activation des RTK s'accompagne d'une augmentation transitoire de la production de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> <sup>259</sup>. Ainsi, l'activation des RTK s'accompagne d'une inactivation transitoire des PTPs et la phosphorylation des RTK résulte donc à la fois de leur transphosphorylation et de l'inhibition de leur déphosphorylation.

*Pour un article de revue sur le sujet, consulter la référence <sup>260</sup>.*

#### **b- Phosphorylation**

Des phosphorylations sur sérine/thréonine et sur des tyrosines sont impliquées dans la régulation de plusieurs PTPs. SHP-1 par exemple est activée par phosphorylation sur tyrosine <sup>261</sup>.

#### **c- Liaison avec un ligand et dimérisation dans le cas des RPTPs**

Les RPTP sont capables de se dimériser, ont des ligands capables d'activer une cascade de transduction de signal, interagissent avec la matrice extracellulaire et avec d'autres cellules par des interactions homotypiques. L'étude des fonctions et de la régulation des RPTP est un domaine en extension qui ne sera pas abordé ici.

*Pour un article de revue sur le sujet, consulter la référence <sup>199</sup>.*

#### **d- Recrutement membranaire**

Les PTPs sont des **protéines modulaires** possédant des domaines d'interaction protéine-protéine en plus de leur domaine catalytique. Les PTPs SHP1 et SHP2 possèdent toutes deux un domaine SH2. Au repos, il existe une liaison intramoléculaire entre le domaine SH2 et le site catalytique qui inhibe leur activité. Suite au recrutement des PTPs sur une phosphotyrosine, le domaine SH2 se déplie, libérant ainsi la contrainte conformationnelle inhibitrice, une étape requise pour l'activation des deux phosphatases.

*Pour un article de revue sur le sujet, consulter la référence <sup>262</sup>.*

Dans le cas de KIT par exemple, il a été établi que la tyrosine 569 (mKIT) est requise pour le recrutement et l'activation de SHP-1 <sup>207</sup>.

Les PTPs peuvent aussi être recrutées de manière indirecte et via d'autres domaines d'interaction protéine-protéine <sup>199</sup>.

#### **e- Protéolyse**

L'activation par protéolyse est courante chez les PTPs, qu'elles soient membranaires ou cytosoliques comme c'est le cas pour SHP-1. Elle est souvent dépendante de l'activité des protéases de la famille des calpaines qui sont activées lors d'un signal calcique.

### **3-D-3-3- Localisation subcellulaire des PTPs**

Grâce à certains domaines et/ou modifications post-traductionnelles, les tyrosines phosphatases sont localisées dans différents compartiments subcellulaires. Les RPTPs sont insérées dans la membrane plasmique mais aussi dans le réseau de membrane interne. Certaines PTPs sont spécifiquement dirigées dans certains compartiments intracellulaires, c'est le cas par exemple de PTP1B qui est localisée dans le réticulum endoplasmique <sup>263</sup>. D'autres sont localisées dans des complexes spécialisés comme les points focaux d'adhésion où elles ont un rôle majeur dans la dynamique du remodelage du cytosquelette d'actine et le contrôle de la morphologie cellulaire. Enfin certaines PTPs sont spécifiquement nucléaires. C'est le cas par

exemples de certaines phosphatases à double spécificité spécifiquement impliquées dans la déphosphorylation des MAPK <sup>199</sup>.

**Les deux grands mécanismes responsables du codage temporel du signal intracellulaire que nous venons de décrire font intervenir et/ou engendrent une ségrégation spatiale de la signalisation. Cette ségrégation spatiale est d'une part nécessaire à la signalisation et d'autre part impliquée dans la spécificité des réponses biologiques.**

### **3-D-4- Localisation du signalosome d'un récepteur**

La signalisation intracellulaire est codée dans le temps mais aussi  **dans l'espace**. La colocalisation des différents composants proximaux d'une voie de signalisation intracellulaire a deux implications majeures. **Sur le plan enzymologique**, elle est avant tout nécessaire. **Sur le plan biologique**, elle contribue à la spécificité de la signalisation et elle permet d'éviter une activation croisée de différentes voies, à moins que celle-ci ne soit régulée et participe alors à la synergie de différents signaux et donc à la régulation globale de la signalisation intracellulaire.

#### **3-D-4-1- Enzymologie de la signalisation**

Les réactions enzymatiques impliquées dans l'initiation de la signalisation cellulaire sont réalisées par des enzymes membranaires sur des substrats parfois cytosoliques. La cinétique de ces réactions se situe entre deux extrêmes possibles que sont une réaction limitée par la probabilité de rencontre enzyme-substrat, c'est-à-dire une réaction limitée par la diffusion, et une réaction limitée par l'efficacité de la réaction elle-même. Des **études modélisant ce type de réactions enzymatiques** ont analysé l'effet du recrutement membranaire des substrats dans la cinétique des réactions.

Ces modèles suggèrent que, quelque soit le type de réaction considéré, **l'augmentation du nombre de complexes de signalisation** est une condition requise pour franchir le seuil nécessaire à la naissance d'une signalisation productive. Le modèle permettant d'expliquer cette augmentation des complexes est **le modèle « piggyback »** dans lequel le substrat est recruté à la membrane via un « récepteur », qui favorise l'interaction du substrat avec l'enzyme. Ce modèle suppose que le recrutement du substrat sur le récepteur n'interfère pas avec l'accessibilité du site substrat de la catalyse effectuée par l'enzyme <sup>264</sup>.

Ce rôle de « récepteur » est parfaitement rempli par les **protéines d'ancrage et les protéines adaptatrices** qui recrutent les substrats à proximité des enzymes, voire sur les enzymes. Par ailleurs la **structure modulaire** des protéines de signalisation permet une dissociation parfaite entre des domaines d'interactions et d'activation, et d'autres à activité catalytique.

Si par ailleurs les « récepteurs » des substrats et les enzymes sont **séquestrés dans des domaines**, c'est-à-dire qu'ils n'ont pas une répartition homogène sur toute la surface cellulaire, et ce quelque soit le type de réactions, la productivité des réactions peut encore être augmentée d'un facteur 1000 <sup>264</sup>. Cette prédiction serait accomplie dans des domaines particuliers de la membrane plasmique appelés radeaux lipidiques ou raft. Ces domaines sont des structures de localisation des signalosomes et ce point sera détaillé par la suite ([paragraphe 3-D-5-1-d](#)).

Beaucoup de réactions initiées au niveau membranaire doivent se propager dans la cellule, et arriver jusqu'au noyau. **Comment l'information est-elle transmise au noyau ou, plus généralement, comment est elle propagée à l'intérieur de la cellule ?**

Kholodenko a utilisé la voie MAPK comme modèle pour répondre mathématiquement à cette question.

Dans un modèle à une couche où la kinase est activée au niveau membranaire et si on suppose une répartition homogène de la phosphatase fonctionnant de manière non saturée, le calcul du gradient de la phosphoprotéine révèle une décroissance exponentielle de la concentration qui passe sous le seuil de productivité très rapidement après la membrane<sup>265</sup>.

Ces modèles nous apprennent (i) que la propagation du signal nécessite d'autres véhicules que la diffusion simple, et (ii) que la distribution spatiale des PTPs peut affecter la propagation du signal de phosphorylation.

Ainsi les ségrégations spatiales des composants de la signalisation sont nécessaires à la réalisation des réactions chimiques impliquées dans la signalisation cellulaire. C'est le cas des PTPs dont la distribution n'est effectivement pas homogène aboutissant à la création de gradients permissifs à la propagation d'un signal de phosphorylation. Cela concerne aussi l'existence d'une signalisation relayée en intracellulaire dans le compartiment endosomal, permettant à la fois une amplification du signal et un rapprochement entre les molécules de signalisation et les effecteurs. Mais au-delà de leur nécessité, ces mécanismes ont évolué de sorte à augmenter encore les combinaisons possibles de codage du signal intracellulaire. Ainsi le système de signalisation intracellulaire est un système hypersensible capable de répondre à de multiples signaux par de multiples réponses biologiques.

### 3-D-4-2- Les endosomes, une structure de localisation et d'amplification Implications dans la spécificité de la signalisation

#### **a- Les endosomes et la signalisation intracellulaire**

Les endosomes constituent un **réseau de membranes** physiquement et biochimiquement **différentes mais interconnectées** par un système de transport très contrôlé. Le compartiment semble donc particulièrement adapté à la ségrégation spatiale de la signalisation intracellulaire.

*Pour des revues bibliographiques sur le sujet, consulter les références<sup>266 267 268</sup>.*

Au milieu des années 90, EGFR et Trka sont décrits comme capables d'induire une signalisation à partir des endosomes.

L'utilisation d'un mutant de la dynamine, ayant pour conséquence l'augmentation du temps de résidence de EGFR à la surface membranaire, a révélé que ce blocage s'accompagnait d'une diminution de l'activation de la voie ERK.

La vision de la **signalisation issue des endosomes** est alors passée de **passive** (simple conséquence du trafic lié à l'endocytose) à **active** <sup>269</sup>.

Ce concept a été élargi à d'autres récepteurs.

Wang et *al*, à l'aide de l'utilisation combinée d'inhibiteurs, ont pu activer sélectivement PDGFR dans les endosomes. Ils montrent que (i) PDGFR endosomal est capable de recruter les adaptateurs classiques que sont SHC et GRB2, ainsi que la PLC $\gamma$ 1 et la p85, (ii) que ceci conduit à l'activation des voies classiques de survie et de prolifération, (iii) et que cette activation endosomale est suffisante pour la prolifération et la survie des cellules <sup>270</sup>.

D'autre part, cette étude et d'autres concernant EGFR, laissent suggérer qu'il pourrait exister une différence qualitative dans les adaptateurs utilisés dans la signalisation membranaire et endosomale.

Le rôle des endosomes dans la signalisation est particulièrement bien établi dans le cadre de la signalisation par les voies MAPK. Il s'agit en effet de l'un des véhicules utilisés pour amplifier et propager le signal à l'intérieur de la cellule, qui ne pourrait sans leur intervention donner naissance à une signalisation productive.

*Pour des articles de revue sur le sujet, consulter par exemple les références* <sup>271 272</sup>.

Comme nous l'avons vu précédemment, cette signalisation à partir des endosomes est possible suite à l'internalisation des RTK activés et à leur transit successif dans le compartiment avant recyclage ou dégradation.

## **b- Contribution au codage spatio-temporel de la signalisation**

La signalisation issue des endosomes participe à la fois au codage temporel et au codage spatial.

La contribution des endosomes au **codage temporel** du signal provient des différences existantes inter RTK à travers leur cinétique d'internalisation, leur capacité à induire une signalisation des endosomes, et leur taux de recyclage.

Leur contribution au **codage spatial** provient du mouvement possible des endosomes et donc du transfert des composants d'une voie de signalisation dans différents espaces de la cellule. En raison des propriétés remarquables du compartiment, ce **transfert est précis, directionnel, et régulable**. Un exemple parlant est celui du transfert du signal reçu par une terminaison axonique vers le corps cellulaire d'un neurone. Le signal ne peut être transmis par diffusion simple. Un des moyens d'assurer cette transmission du signal est le transport rétrograde des endosomes contenant le RTK activé sur le réseau de microtubules. Dans le cas du signal NGF-TrkA, ce transport est nécessaire à la survie des neurones<sup>273</sup>.

*Pour un article de revue sur le sujet, consulter la référence<sup>274</sup>.*

Un autre mécanisme impliqué dans le **codage spatial** du signal par les endosomes est lié à l'existence d'une part de protéines d'ancrage différentes de celles exprimées à la membrane et d'autre part de différents endosomes exprimant différentes protéines d'ancrage. L'encodage de l'intensité de stimulation peut se traduire par une endocytose différentielle des récepteurs. Il est possible que cette intensité puisse aussi conduire à l'adressage des récepteurs dans des endosomes particuliers, pouvant médier des voies de signalisations particulières.

Dans l'étude de De Donatis précédemment introduite, les cellules en migration activent préférentiellement la voie Rho-Rac-FAK et les cellules en division les voies AKT et ERK. Ces différences pourraient s'expliquer par la nécessité de passer par certains compartiments cellulaires pour activer certaines voies dans un contexte cellulaire donné. De nombreux exemples documentent cette hypothèse mais il ne semble pas encore se dégager de schéma général.

*Pour un article de revue sur le sujet, consulter la référence<sup>275</sup>.*

**Ainsi les endosomes sont des plateformes de signalisation qui permettent une compartimentalisation spatiale et temporelle de la signalisation ayant un rôle majeur dans la spécificité et la régulation de la signalisation intracellulaire.**

### **c- Eléments de discussion**

Comme le compartiment endosomale est aussi impliqué dans la terminaison de la signalisation via la formation des MVBs, il doit exister des mécanismes de seuillage permettant la coordination et la régulation de ces deux issues apparemment opposées. Vraisemblablement l'ubiquitine est engagée dans cette régulation. Le nombre de domaines protéiques impliqués dans la liaison avec l'ubiquitine (UBDs) ne cesse d'augmenter. Ils étaient seize décrits en 2006<sup>276</sup>. Ces domaines interagissent avec différentes configurations de chaînes. Le nombre de protéines possédant ces domaines est lui aussi conséquent et il existe de nombreuses enzymes capables de créer et/ou de modifier le signal « ubiquitine » d'un cargo. L'ubiquitine est un messager intracellulaire à part entière et il est à parier qu'outre sa contribution au seuillage décisionnel entre dégradation et recyclage des RTK activés d'autres rôles devraient apparaître et ajouter un niveau de complexité supérieur à la spécificité de la signalisation.

*Pour un article de revue sur le sujet, consulter la référence<sup>245</sup>.*

### **3-D-5- La signalisation à l'échelle cellulaire**

La cellule reçoit de son environnement **quantité d'informations** contenues dans les médiateurs chimiques des différents systèmes de communications cellulaires. Ces signaux peuvent parfois porter des informations contradictoires. Les différents récepteurs transmettent les informations sur des voies de signalisation intracellulaire branchés les unes aux autres. **L'intégration à différents niveaux du réseau** permet ainsi d'obtenir une réponse biologique cohérente et unique résultant de l'analyse et du traitement d'entrées multiples.

Ce paragraphe décrit quelques exemples de mécanismes permettant **l'intégration de différents signaux entrants**, en prenant en exemple le signal KIT comme base d'une synergie. Une analyse beaucoup plus globale peut être réalisée grâce à la modélisation des réseaux de signalisation intracellulaire, un domaine de la biologie systémique actuelle qui sera développé au paragraphe suivant.

### 3-D-5-1- Intégration membranaire

De nombreux travaux décrivent une synergie entre la voie SCF/KIT et d'autres voies de signalisation intracellulaire.

La voie SCF/KIT agit en synergie avec les voies des facteurs de croissance GM-CSF<sup>277</sup> et Epo<sup>278</sup>, les voies des cytokines IL3<sup>279</sup> et IL15<sup>280</sup> mais aussi avec des récepteurs d'adhésion tels que les intégrines  $\alpha 4\beta 1$  et  $\alpha 5\beta 1$ <sup>281</sup>. KIT agit aussi en synergie avec les récepteurs Fc $\epsilon$ RI dans le contrôle de la dégranulation des mastocytes<sup>282 137</sup>.

En général, ces études suggèrent que ces synergies ne sont pas dépendantes de variations d'expression ou d'affinité des récepteurs pour leur ligand. La **synergie** semble plutôt s'effectuer au niveau des voies de signalisation intracellulaires, et **l'intégration a lieu au niveau proximal** directement **entre les récepteurs** ou via **les plateformes d'ancrage**. Les synergies peuvent être **positives** ou **négatives**. Un exemple de synergie négative (appelé dans ce cas antagonisme) est décrit dans le cas de l'interaction entre KIT et les intégrines  $\alpha 4\beta 1$ <sup>281</sup>. Deux exemples de synergies positives sont détaillés dans la suite.

#### a- Synergie au niveau des récepteurs

L'exemple d'une **synergie directe entre les récepteurs** est documenté dans le cas de KIT et EpoR.

**La voie Epo/EpoR** est indispensable au cours de l'érythropoïèse définitive embryonnaire<sup>283 284</sup> et adulte<sup>285</sup>. L'activation de l'EpoR est impliquée dans la survie, la prolifération mais aussi la différenciation terminale des précurseurs érythroïdes<sup>286</sup>.

De même **la voie SCF/KIT** joue un rôle fondamental dans l'érythropoïèse précoce, comme l'atteste le phénotype anémique des souris déficientes *W* ou *Sl*<sup>18</sup>.

KIT et EpoR ont tous deux des fonctions majeures dans la régulation de l'érythropoïèse et leur synergie a donc été étudiée de longue date.

En co-stimulation, leur effet synergique sur l'érythropoïèse corrèle avec l'activation synergique de la voie ERK<sup>287</sup>. L'intégration a lieu au niveau des récepteurs. **KIT et EpoR interagissent à la membrane**<sup>278</sup>, et **KIT est**

**capable de phosphoryler EpoR** directement et indirectement via l'activation des SFK<sup>288 179</sup>.

### **b- Synergie au niveau des protéines d'ancrage**

L'exemple d'une **synergie indirecte via les protéines d'ancrage** est documenté dans le cas de la potentialisation par KIT de la dégranulation médiée par les IgE dans les mastocytes.

L'induction de la dégranulation mastocytaire par la voie SCF/KIT seule est controversée<sup>77 74</sup>. Cependant il est bien décrit que le signal issu de **la stimulation de KIT potentialise la dégranulation** induite après **agrégation des récepteurs FcεRI** par les antigènes. Voir par exemple les nombreux travaux de l'équipe de DD Metcalfe et AM Gilfillan.

Au sein de l'organisme, la stimulation des FcεRI se fait dans le contexte d'une signalisation active de KIT qui assure la survie et la maturation des mastocytes<sup>289</sup>.

Les travaux récents de l'équipe de DD Metcalfe et AM Gilfillan ont analysé cette **synergie sur le plan moléculaire** dans des mastocytes humains.

La première étude de Hundley et al<sup>282</sup> révèle que le SCF est incapable d'induire la dégranulation des mastocytes sevrés; il agit bien en synergie avec une stimulation antigénique, et ce en stimulation transitoire ou dans le contexte plus physiologique de la présence de SCF en continue.

L'activation des PKC et l'augmentation de la concentration du Ca<sup>2+</sup> intracellulaire (suite à l'activation des PLCγ) sont largement impliqués dans la dégranulation. De fait, la PLCγ1 est activée par les deux stimulations SCF et IgE. Cependant l'augmentation du Ca<sup>2+</sup> intracellulaire, bien que de même intensité, est plus rapide après stimulation antigénique qu'après stimulation au SCF. La translocation successive des PKC est efficace dans le cas de la stimulation IgE et pas de la stimulation SCF.

Ainsi, la synergie pourrait passer par l'activation de la voie calcique par KIT.

Dans le contexte d'une activation de KIT, il existe un **amorçage de la voie** (priming) qui équivaut à un **abaissement du seuil de stimulation** efficace pour

induire la dégranulation suite à une stimulation antigénique. De fait, la concentration minimale d'IgE capable d'induire une dégranulation efficace est largement réduite en présence de SCF<sup>137</sup>.

Les deux études suivantes se sont attelées à la **recherche des éléments proximaux impliqués dans la synergie**.

L'étude de Tkaczyk et al<sup>290</sup> montre que l'activation de KIT et du FcεRI induisent la phosphorylation de LAT2 (NTAL) en stimulation unique ou cumulée, et ce de manière synergique. L'étude suivante de Iwaki et al<sup>137</sup> montre que la phosphorylation de LAT2 requiert l'activité de SYK et LYN sous stimulation antigénique alors que KIT phosphoryle LAT2 de manière directe. De plus il existe une différence qualitative entre les tyrosines de LAT2 phosphorylées par les trois kinases. LAT2 joue un rôle fondamental dans la dégranulation et dans la synergie entre les deux récepteurs puisque la protéine est requise pour la dégranulation<sup>290 137</sup>. Sur le plan moléculaire, LAT2 est capable de recruter de nombreuses protéines dont l'adaptateur GRB2 et les enzymes PLCγ1 et PLCγ2.

**LAT2 serait le coordinateur des deux voies.** Il intègre l'activité de la voie d'amplification issue de KIT et celle issue du FcεRI via le recrutement de différentes protéines, et l'intégration se traduit par l'augmentation ou non de l'activité PLCγ1 et de la dégranulation qui en découle<sup>143</sup>.

### **c- Contrôle combinatoire et spécificité**

Comme mentionné précédemment, les mastocytes expriment différentes protéines d'ancrage telles que GAB2 et LAT2.

Si LAT2 a un rôle fondamental dans la fonction de dégranulation, GAB2 est requis dans la fonction de prolifération/différentiation. GAB2 est une protéine d'ancrage qui est localisée à la membrane par son domaine PH et peut recruter de nombreux interacteurs protéiques via ses nombreuses tyrosines intracellulaires et ses motifs poly-proline<sup>139</sup>.

Les souris déficientes *Gab2* *-/-* ont un défaut dans le compartiment mastocytaire, et *in vitro*, la prolifération SCF-dépendante des BMMC dérivés de ces animaux est largement diminuée<sup>165</sup>.

GAB2 est phosphorylée suite à l'activation de KIT par le SCF et, dans les cellules déficientes *Gab2* *-/-*, la stimulation de KIT montre une activation moins intense et plus rapidement éteinte des kinases AKT et ERK.

GAB2 agit bien comme une **voie de renforcement** dans les mastocytes et semble préférentiellement impliquée dans la fonction proliférative.

Ces deux exemples suggèrent que l'utilisation de différentes protéines plateformes pour l'amplification du signal SCF/KIT et son intégration avec d'autres signaux sur des plateformes spécifiques peut être responsable d'effets biologiques différents.

Les membres des familles GAB et LAT sont largement exprimés dans les cellules du système immunitaire et ont de multiples rôles dans la signalisation intracellulaire<sup>140 141</sup>.

Le contrôle combinatoire de l'utilisation des protéines plateformes dans la signalisation des récepteurs membranaires est vraisemblablement un des mécanismes fondamentaux assurant la spécificité de la réponse biologique en fonction de l'intégration de plusieurs signaux entrants.

#### **Mais comment ce contrôle combinatoire est-il possible ?**

La localisation potentielle de différentes protéines d'ancrage dans différents microdomaines membranaires appelés radeaux lipidiques et leur agrégation différentielle pourraient expliquer ce contrôle combinatoire. Ce point est détaillé dans le paragraphe suivant.

Ainsi, **les synergies positives** entre récepteurs se traduisent par un **amorçage des voies de signalisation** conduisant à l'abaissement des seuils de stimulation. Ainsi pour chacun des récepteurs concernés, le plus petit stimulus capable d'évoquer une réponse est diminué. A l'inverse, **les synergies négatives** (stimulation antagonistes) telle que la trans-inactivation observée entre les GCPR et

les RTK conduisent à une augmentation des seuils c'est à dire à une désensibilisation des récepteurs.

*Pour un exemple de désensibilisation entre EGFR et les GCPR, consulter la référence <sup>291</sup>*

#### **d- Intégration spatiale de plusieurs activations - Importance des radeaux lipidiques**

##### ***Définition des radeaux lipidiques***

Dans le modèle de la **mosaïque fluide** de Singer et Nicolson <sup>292</sup>, la membrane est un solvant bidimensionnel neutre dans lequel les protéines flottent comme des icebergs dans un océan de lipides. Cependant les travaux actuels révèlent qu'il n'existe pas une répartition homogène des lipides dans la membrane et que cette distribution non homogène impose une certaine organisation de la distribution des protéines membranaires. Des **structures lipidiques organisées sont appelées rafts, ou radeaux lipidiques.**

Les rafts sont des domaines membranaires **enrichis en cholestérol et sphingolipides**, contenant des phospholipides aux chaînes d'acides gras plus saturés que les autres phospholipides membranaires. La composition biochimique de ces domaines donne naissance à des patchs ayant une phase différente du reste de la membrane, ce qui s'accompagne d'une **diminution de leur fluidité**. La phase des rafts est de type liquide ordonnée (Lo : liquid-ordered) par apposition au reste de la membrane qui est en phase liquide désordonnée (Ld : liquid-disordered).

##### ***Raft et Compartmentalisation membranaire***

Depuis leur existence postulée il y a 20 ans, les rafts font l'objet de nombreux débats, en particulier du fait de la difficulté de prouver leur existence dans les cellules vivantes. En effet, la taille des rafts est en deçà du seuil de résolution de la microscopie visible classique et les techniques d'isolation biochimiques peuvent faire varier leur composition. Les techniques modernes convergent sur l'existence de **nanoclusters membranaires** (10 à 100 nm de diamètre, <20nm en général) **hautement dynamiques** (durée de vie de l'ordre de la seconde). La portion « raft »

de la membrane plasmique varie en fonction du type cellulaire mais pourrait représenter jusqu'à 50% de la surface.

*Pour une revue sur les techniques classiques de caractérisation des rafts, consulter la référence <sup>293</sup>. Pour une revue sur les techniques récentes de visualisation, consulter la référence <sup>294</sup>.*

L'étude de membrane modèle artificielle montre que l'auto organisation des lipides est capable d'inclure en son sein différentes **protéines dites à affinité pour les rafts**. Dans la membrane plasmique, les protéines retrouvées associées au raft sont : (i) les protéines à ancre GPI (glycosyl-phosphatidilinositol), (ii) les protéines bi-acétylées comme les **SFK** et la sous-unité  $\alpha$  des petites protéines G, (iii) les protéines palmitoylées ou liées au cholestérol (cas de la cavéoline), (iv) certaines protéines transmembranaires en particulier celles palmitoylées (famille **LAT** par exemple) et certains RTK.

Le **nombre de protéines incluses dans un raft** ne dépasse pas 10 à 30. Une question majeure est de savoir si ces protéines sont distribuées de manière aléatoire ou s'il existe des rafts spécialisés. A l'heure actuelle plusieurs études tendent à montrer l'existence de rafts spécialisés avec une répartition non aléatoire des protéines.

*Pour des exemples précis, consulter la revue <sup>295</sup>.*

### **Signalisation à partir des radeaux lipidiques**

Bien que controversée sur certains points et soulevant encore de nombreuses questions, l'implication des raft dans la signalisation intracellulaire est largement établie. Ce paragraphe souligne cette implication.

L'une des premières démonstrations du rôle fonctionnel des rafts dans la signalisation a été établi dans la **réponse des mastocytes à la stimulation par les IgE**.

Les études montrent que, suite à leur agrégation, les récepteurs Fc $\epsilon$ RI se retrouvent dans un domaine résistant aux détergents de type raft. La taille de ce raft qui est visible en microscopie à fluorescence <sup>296</sup>, suggère qu'il résulte

de l'agrégation de plusieurs rafts. Finalement, l'intégrité des rafts est nécessaire à la signalisation (consulter par exemple la référence <sup>297</sup>)

L'hypothèse de travail est que **l'agrégation des récepteurs augmente le temps de résidence des FcεRI dans les rafts**, conduisant à la rencontre avec la SFK lyn qui phosphoryle alors les motifs ITAMs des chaînes β et γ du récepteur ainsi que les tyrosines des protéines d'ancrage telles que LAT qui est une protéine résidente des rafts.

L'agrégation des rafts est par ailleurs favorisée par le **recrutement de protéines adaptatrices** qui de part leur interaction avec des nombreux partenaires assurent la cohésion du signalosome et l'amplification du signal.

L'agrégation des rafts expose les protéines à un **nouvel environnement membranaire** enrichi en certaines enzymes et protéines d'ancrage, excluant par ailleurs certaines autres protéines pouvant avoir une action antagoniste. De plus la concentration des molécules de signalisation permet l'amplification du signal

### ***Rôle des rafts dans l'intégration des signaux membranaires et implication dans la spécificité de la signalisation intracellulaire***

Ce paragraphe décrit les rôles fonctionnels possibles des rafts dans la régulation et la spécificité de la signalisation intracellulaire. Pour chaque hypothèse décrite, il existe des données expérimentales en faveur qui ne seront pas développées ici, l'objectif étant de donner un aperçu de la diversité des fonctions pouvant être exercées par les rafts. *Ces hypothèses sont issues de l'article de revue de LJ Pike dans lequel des exemples sont détaillés* <sup>295</sup>.

Dans le **cas le plus simple**, chaque raft contient un récepteur et les protéines impliquées dans sa signalisation. Ils fonctionnent comme des plateformes de signalisation dont le rôle est de colocaliser/mettre en contact les différents acteurs d'une voie, facilitant ainsi la naissance des réactions enzymatiques et donc de la signalisation (*confer enzymologie de la signalisation, paragraphe 3-D-4-1*). Les plateformes de signalisation contenues dans les rafts sont incomplètes et deviennent actives lorsque qu'un récepteur est engagé par son ligand et recrute les constituants

manquants des voies. Leur rôle serait donc de permettre une signalisation rapide et efficace facilitée par la mise en proximité des enzymes et des substrats.

Si par ailleurs il existe **différents rafts contenant différentes plateformes**, et que les **récepteurs sont restreints dans des types particuliers de raft**, alors la spécificité de la signalisation est liée à la distribution spécifique des composants. Ceci contribue au **codage spatial** de la signalisation intracellulaire et permet aussi d'éviter les activations croisées. Enfin la localisation des rafts pourrait permettre une **activation focale** de la signalisation, c'est-à-dire en un point particulier de la cellule.

Dans des **modèles plus complexes**, on peut envisager que (i) à l'état basal, différents composants complémentaires de voies de signalisation intracellulaires sont séquestrés dans différents radeaux. Ceux-ci ne fusionnent que suite à l'engagement d'un récepteur. Ou alternativement (ii) tous les composants d'une voie sont présents dans un raft et s'activent lorsque le récepteur est recruté dans le raft alors qu'il n'y était pas au préalable. Dans ces scénarios, certaines voies seraient spécifiquement altérées après un traitement perturbant la structure des rafts, une observation qui est vérifiée expérimentalement.

Dans le **cas des RTK**, différents récepteurs ont des **coefficients de partition différents** entre les phases rafts et non rafts de la membrane. Dans un **modèle subtil**, l'activation simultanée de plusieurs RTK conduit à la localisation préférentielle de certains RTK dans certains radeaux, permettant l'activation de voies différentes ou identiques (antagonisme ou synergie). Ce modèle pourrait rendre compte du contrôle combinatoire précédemment explicité et permettre à la fois une **intégration spatiale** de différents signaux entrants mais aussi une **intégration temporelle** qui serait fonction du type de rafts déjà engagés dans une signalisation et donc des plateformes restantes pour l'intégration de nouveaux signaux.

Enfin les rafts pourraient remplir **d'autres fonctions régulatrices**. Par exemple ils pourraient être impliqués dans le maintien à l'état inactif des protéines situées dans les rafts ; ce de part l'environnement lipidique particulier ou par la colocalisation de deux protéines antagonistes. Une fois de plus cette hypothèse est appuyée par des données expérimentales révélant un comportement différent de certains RTK lorsqu'ils sont ou non localisés dans les rafts. Enfin, ils sont sûrement

impliqués dans la terminaison de la signalisation comme mentionné précédemment pour l'endocytose RME.

Il est à noter que si les rafts sont abondants à la membrane plasmique, ils sont aussi présents dans les endomembranes des réseaux de biosynthèse et d'endocytose. Ainsi les possibilités d'intégration différentielle des signaux membranaires liés à l'existence des rafts peuvent être transposées en intracellulaire du fait de la localisation quasi inévitable des RTK activés dans les endosomes.

Ainsi, les rafts semblent jouer un rôle fondamental dans la signalisation bien qu'aucun des modèles présentés ne soit pour le moment définitivement démontré. Ces modèles ne sont d'ailleurs pas exclusifs et les données expérimentales semblent suggérer qu'ils puissent être tous utilisés en fonction du type cellulaire ou du récepteur considéré.

**Les rafs ont un rôle majeur dans la ségrégation spatiale de la signalisation, facilitant les réactions chimiques, limitant ou facilitant les interactions entre les voies.**

La membrane n'est plus la mosaïque fluide de Singer et Nicolson, elle est compartimentée. Cette compartimentalisation conduit à l'existence de différentes bioactivités de certains sous domaines membranaires. En effet, en dehors des rafts, la membrane présente d'autres sous domaines contenant des clusters de macromolécules. Ces domaines incluent des structures adhésives, des invaginations (CCPs et cavéoles), et des microdomaines moins bien définis comme les lattices (riches en glycoprotéines et lectines). Les fonctions connues de ces sous domaines devraient s'étendre avec leur caractérisation.

*Pour un article de revue sur le sujet, consulter la référence <sup>298</sup>.*

### 3-D-5-2- Intégration dans les voies

C'est parce que les différents récepteurs membranaires utilisent un réseau commun pour transmettre l'information que l'intégration peut se faire au niveau des voies.

#### **a- Au niveau protéique**

Les boucles de rétrocontrôle positives et négatives enclenchées suite à l'activation d'un récepteur peuvent agir sur la signalisation d'un autre récepteur lorsque les voies activées sont identiques. Les boucles permettent alors l'intégration des signaux dans la voie, potentialisant ou inhibant le signal de la voie commune.

#### **b- Au niveau transcriptionnel**

L'activation d'une voie peut synergiser avec une autre via une régulation transcriptionnelle des constituants de la voie.

C'est le cas par exemple dans la synergie KIT/EpoR. En plus de la synergie décrite sur la voie ERK, il a été établi que la synergie fonctionnelle de KIT et EpoR corrèle avec l'activation synergique de STAT5. Une étude suggère que la stimulation de KIT conduit à une augmentation de la transcription de STAT5 et de l'EpoR augmentant ainsi le pool de STAT5 activable suite à l'engagement de l'EpoR par l'Epo<sup>299</sup>.

### 3-D-5-3- Importance du contexte cellulaire

Des voies de signalisation intracellulaires identiques utilisées par des récepteurs différents dans des cellules différentes peuvent avoir des conséquences variées.

Par exemple, l'activation de la voie PI3K par le récepteur à l'insuline dans une cellule hépatique augmente le métabolisme cellulaire, alors que cette même voie transmet un signal anti-apoptotique dans un neurone stimulé par le NGF.

L'identité cellulaire définit le pool de molécules de signalisation existantes, c'est-à-dire que si l'on emprunte une notion probabiliste, **l'identité cellulaire définit l'ensemble des possibles**. Il est clair que certaines molécules sont spécifiquement exprimées dans certains types cellulaires et leur agencement définit a priori les relations inputs/outputs.

Mais **l'histoire cellulaire** peut aussi être à l'origine de l'existence de répertoires préexistants de facteurs de transcription et de coactivateurs ou répresseurs transcriptionnels. Une même stimulation dans des cellules différentes peut donc conduire à la transcription de gènes différents par l'association différentielle des facteurs préexistants avec les facteurs activés suite à la stimulation. Et enfin, une stimulation identique dans une même cellule mais à des stades de différenciation différents peut avoir des conséquences biologiques distinctes.

**Le contexte cellulaire a donc une importance fondamentale dans la réponse biologique.**

### **3-D-6- Conclusion**

Le séquençage du génome a révélé qu'il existe moins de gènes que de processus biologiques. La spécificité des réponses cellulaires ne peut donc être appréhendée à l'échelle de la protéine ou du gène. Elle provient plutôt de l'intégration spatiale et temporelle des informations entrantes dans un réseau de signalisation intracellulaire dont les propriétés remarquables font qu'il est capable de transformer une quantité quasi infinie de signaux d'entrée en autant de variations spatio-temporelles du signal intracellulaire en utilisant un nombre limité de protéines qui ont évolué de sorte à optimiser le fonctionnement du réseau. Ceci est parfaitement illustré dans la structure modulaire des protéines qui autorise la réalisation de plusieurs fonctions à « moindre coût génomique ».

*Pour un article de revue sur le sujet, consulter la référence <sup>300</sup>*

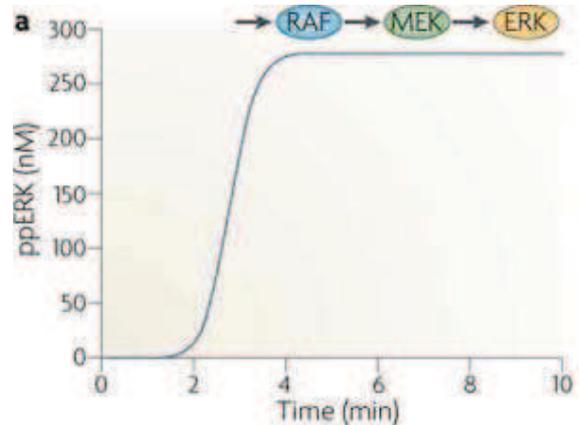
A ce stade, on pourrait vouloir appréhender ce que ces possibilités de codage spatio-temporel représentent. Visualisons l'exemple de différents signaux de sortie possibles en réponse à une stimulation continue invariable. Considérons l'exemple

de la stimulation continue d'une voie possédant un unique rétrocontrôle négatif. La modélisation de ce système montre qu'en fonction de la force de la rétroaction et de la concentration nécessaire au rétroacteur pour exercer son effet, on peut avoir au moins quatre types de signaux de sortie différents pour un même signal d'entrée qui sont représentés sur la [figure 21](#) extraite de <sup>301</sup>.

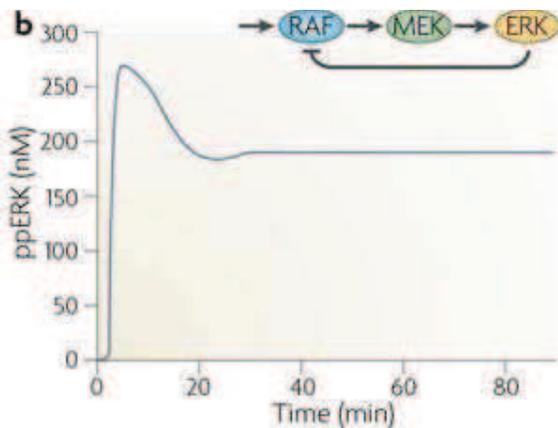
**Figure 21 : Modélisation de la réponse dynamique de la voie MAPK-ERK.**

Les graphes représentent le profil d'activation de ERK (concentration des formes phosphorylées) en fonction du temps. Différents cas sont présentés en fonction de la présence ou non d'un rétrocontrôle négatif de ERK sur RAF.

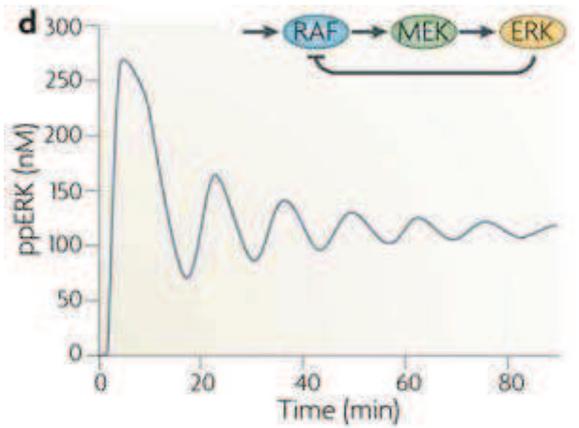
Figures extraites de <sup>301</sup>



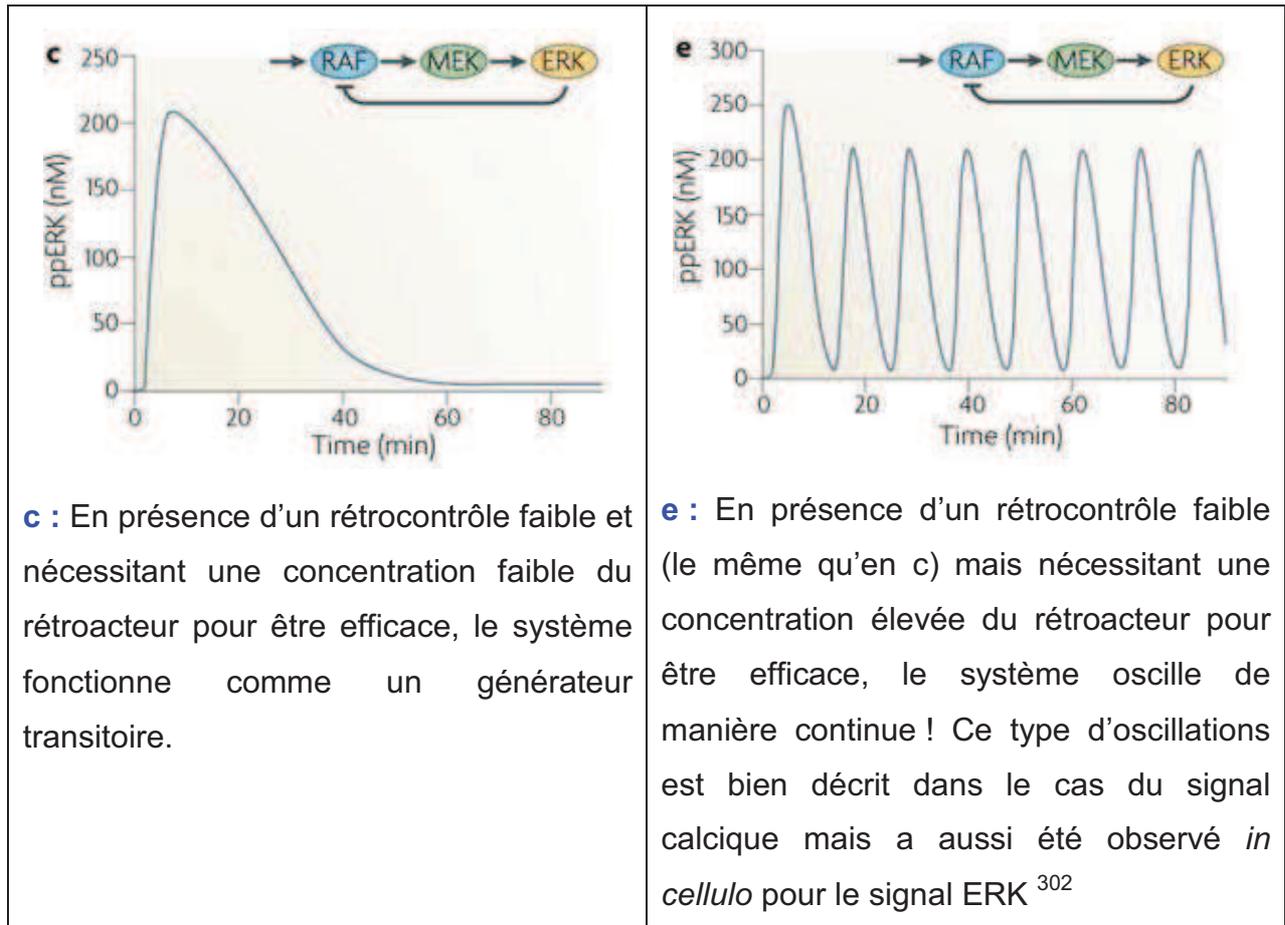
**a :** En l'absence de rétrocontrôle, on a une réponse monotone continue de type homéostat



**b :** En présence d'un rétrocontrôle fort et nécessitant une concentration élevée du rétroacteur pour être efficace, le système fonctionne comme un limiteur, c'est-à-dire qu'il transmet le signal entrant en diminuant son intensité.



**d :** En présence d'un rétrocontrôle un tout petit peu moins fort qu'en b et nécessitant une concentration élevée du rétroacteur pour être efficace (la même qu'en b), le système fonctionne toujours comme un limiteur mais il oscille avant de stabiliser le signal transmis.



Pour avoir un aperçu visuel très parlant de ce que deviennent ces signaux lorsque l'on superpose les boucles de rétrocontrôle, consulter les graphiques de l'article de revue <sup>303</sup>.

Ainsi, **la signalisation est un ballet dans l'espace et dans le temps**. Nous avons détaillé certains des mécanismes permettant le codage spatial et temporel de l'information transmise dans les réseaux de signalisation intracellulaire. Ces mécanismes que nous commençons à entrevoir et dont la description et la compréhension fine devraient s'enrichir dans les années à venir permettent *in fine* à la signalisation intracellulaire d'atteindre un degré extrême de spécificité pouvant ainsi conduire à des effets biologiques pléiotropes.

Pour plus de détails sur le sujet, consulter la revue « Signaling ballet in space and time » de Kholodenko et collaborateurs <sup>301</sup>.

Nous avons accumulé une quantité énorme de connaissances sur les voies de signalisation intracellulaires activées par une stimulation particulière et sur les mécanismes de leur régulation. Nous commençons à entrevoir certains des mécanismes assurant le codage spatio-temporel de l'information et l'intégration de quelques signaux différents à l'échelle cellulaire.

Pour autant, nous ne comprenons pas vraiment comment l'ensemble des informations sont intégrées et analysées par la cellule afin de générer la diversité des réponses biologiques impliquées dans le développement et la physiologie des organismes pluricellulaires. Pour tenter de répondre à ces questions, une nouvelle discipline modélise de manière globale la signalisation intracellulaire sous forme de réseau afin de prédire les réponses possibles en fonction du traitement de différentes entrées. Cette nouvelle approche est réalisée par une branche de la biologie systémique que nous présentons au paragraphe suivant.

### **3-E- Modélisation des réseaux de signalisation et Biologie Systémique**

Un **système** est une combinaison de composantes physiques reliées de telle sorte qu'elles agissent ensemble, et dans lequel les propriétés de l'ensemble sont le résultat des relations entre les parties qui le composent. Les systèmes sont aussi divers que les systèmes solaires, les systèmes électroniques, les écosystèmes, les systèmes biologiques ou les systèmes de pensées. Quelque soit le système considéré, il est difficile de **prévoir les propriétés d'un système** si l'on se limite à l'étude de ses différentes parties. Le système dans son ensemble a des "propriétés émergentes", ou caractéristiques, qui surgissent à un certain niveau de complexité mais n'existent pas à des niveaux plus bas.

La **biologie systémique** est une nouvelle approche interdisciplinaire de la biologie qui étudie les interactions entre les différents systèmes biologiques à différentes échelles. Il existe des systèmes à l'échelle des organes, comme le système nerveux ou des systèmes à l'échelle moléculaire comme les systèmes de signalisation qui constituent un des domaines de la biologie systémique parmi d'autres. Pour observer simultanément tous ces systèmes d'éléments, la biologie systémique a recours aux différents domaines de la biologie à haut débit (génomique, transcriptomique, protéomique, métabolomique, etc.). Face à ce déluge d'information, sa première vocation est de réaliser l'intégration des données dans des modèles conceptuels. L'objet de tels modèles est d'expliquer les mécanismes de fonctionnement des systèmes étudiés et de prédire leur comportement et leur évolution (de « Biologie Systémique », collection Ecrin, par Magalie Roux).

**Les systèmes biologiques**, comme beaucoup d'autres systèmes sont des systèmes robustes, et des systèmes capables d'évoluer. Ils sont robustes, c'est à dire qu'ils sont capables d'être performants en dépit de perturbations internes et externes. Ils sont capables d'évoluer, c'est-à-dire de générer des variations transmissibles. Ces deux propriétés sont inhérentes aux systèmes biologiques et proviennent de différentes caractéristiques organisationnelles. A l'échelle cellulaire, le réseau de signalisation intracellulaire est un exemple de sous système robuste, capable d'évoluer.

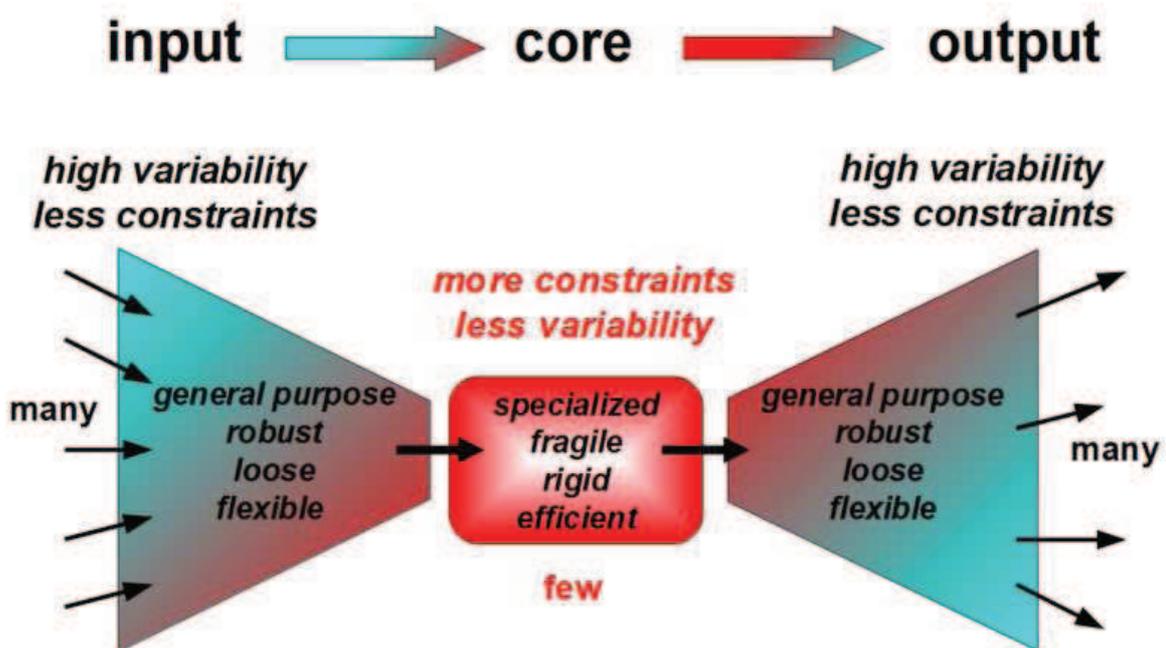
### 3-E-1- Analyse systémique de la signalisation intracellulaire

La suite de ce paragraphe est issue de la lecture de plusieurs revues sur le sujet réalisées par le Pr Yosef Yarden (Department of Biological Regulation, The Weizmann Institute of Science, Rehovot, Israel) <sup>122 304 305</sup>.

Les caractéristiques de la signalisation intracellulaire sont présentées selon une approche d'analyse systémique afin de dégager les propriétés responsables de la robustesse du système.

La signalisation intracellulaire enclenchée par un RTK peut être modélisée par un **réseau possédant une architecture en nœud papillon** (bow-tie architecture) (Figure 22). Les entrées (input layer) sont les ligands et les sorties sont les différentes réponses biologiques (output layer). L'étage de la transduction du signal est constitué du récepteur tandis que les effecteurs sont les facteurs de transcription. Entre les deux se trouve la machinerie impliquée dans le traitement du signal, c'est-à-dire les voies de signalisation (core process) et les systèmes de contrôles. Le core process est constitué de sous réseaux qui fonctionnent en parallèles mais qui sont branchés les uns aux autres.

Figure 22 : Schéma général d'une architecture en noeud papillon (Bow Tie)



L'ensemble des signaux reçus par une cellule est traité par des réseaux qui fonctionnent comme des **unités fonctionnelles semi-autonomes**. Ces unités (ou modules) sont largement connectées entre elles mais relativement déconnectées de l'environnement. Ces unités sont aussi souvent **redondantes**. La dégénérescence fonctionnelle de certains constituants ou de modules entiers offre une possibilité de réponse alternative face à des perturbations sévères. La réponse peut donc être plastique. Cette **structure modulaire redondante** permet un confinement éventuel des dommages sans affecter le fonctionnement global du réseau. En effet le système peut fonctionner normalement même après isolement d'un module ayant subi des avaries empêchant sa marche normale grâce à une re-direction du signal au travers de modules dégénérés.

Le réseau contient par ailleurs des systèmes de contrôle qui lui sont propres ainsi que des systèmes tampons. Les **systèmes tampons** assurent dans une certaine mesure la réparation des constituants endommagés pour assurer le bon fonctionnement en dépit des perturbations (c'est la fonction des protéines chaperones). Les **systèmes de contrôles** sont constitués de circuits intégrés de boucles de rétrocontrôle négatives et de boucles de renforcement qui assurent le maintien de relations dynamiques et équilibrées entre les entrées et les sorties (contrôle dynamique de l'amplitude, de la cinétique et de la fréquence du signal de sortie en fonction du signal d'entrée). Ces mécanismes permettent de plus de distinguer le signal du bruit de fond et confèrent une résistance aux perturbations.

Ainsi **plusieurs propriétés du système de signalisation intracellulaire lui confèrent sa robustesse**. L'existence de la structure modulaire et de la redondance réduit par ailleurs les contraintes liées aux changements, permettant une accumulation non létale de variations. C'est une caractéristique fondamentale des **systèmes évolutifs** <sup>306</sup>.

### **3-E-2- Ce que nous apprend la modélisation**

La nature complexe et dynamique des réseaux de signalisation rend leur description fine extrêmement compliquée même dans un système cellulaire bien

étudié. Les reconstitutions *in silico* sont devenues des outils très utiles dans la description des réseaux.

Par exemple, des modélisations successives de la signalisation EGFR avaient prédit que (i) la cinétique de phosphorylation du récepteur était définie par les interactions du récepteur avec les protéines adaptatrices qui protègent les tyrosines phosphorylées de la déphosphorylation (ii) et que l'efficacité du signal MAPK transmis en aval de ERBB1 dépendait de l'affinité du ligand pour le récepteur et ce en affectant la vitesse initiale d'activation du récepteur. Ces prédictions mathématiques ont par la suite été vérifiées expérimentalement.

Une propriété très intéressante et qui motive le développement de la modélisation mathématique des réseaux est que celle-ci fait apparaître des **paramètres fonctionnels inattendus** ainsi que des **comportements émergents** qui ne peuvent être prédits par l'analyse des composants pris isolément mais uniquement par l'interaction des composants entre eux.

Elle peut ainsi permettre d'expliquer certains **phénomènes fondamentaux incompris** jusqu'alors ; c'est le cas par exemple de la propagation possible à longue distance du signal MAPK via des vagues<sup>307</sup>. Et aussi fournir une **explication à d'apparents paradoxes** (phénomènes non-intuitifs) ; c'est le cas par exemple de l'explication suggérée à l'existence d'un mutant d'EGF possédant une faible affinité pour le récepteur mais un pouvoir mitogène plus important que l'EGF sauvage. D'après la modélisation de l'endocytose de ERBB1, cet effet serait lié à l'augmentation du recyclage du récepteur, une hypothèse qui, là encore, s'est vérifiée expérimentalement. De manière encore plus intéressante, ce même mécanisme serait utilisé par des ligands EGF-like synthétisés par les pox virus<sup>305</sup>.

Elle peut aussi permettre de **dégager des phénomènes généraux**. Par exemple la modélisation de l'endocytose d'ERBB1 prédit que celle-ci est un effet protecteur à haute concentration de ligand alors qu'elle a plutôt un rôle d'amplificateurs de signal à faible concentration de ligand.

Les modèles se nourrissent de **données expérimentales** afin de définir des limites et d'introduire dans les simulations des valeurs numériques compatibles avec la réalité. Par ailleurs les résultats issus des modélisations ne sont utiles que s'ils sont ultérieurement testés expérimentalement afin de faire des découvertes mais

surtout de ré implémenter les modèles (feedback !!!). Le développement futur de la biologie systémique requiert **l'acquisition de données quantitatives et cinétiques** et de préférence pouvant être comparées entre elles. Ceci serait permis par le développement de protocoles de standardisation des conditions expérimentales et d'acquisition des résultats. Voir par exemple les protocoles proposées par 'Alliance for Cell Signaling' (AFCS: <http://www.signalinggateway.org/>) et le RTK consortium (<http://www.rtkconsort.org/>). L'objectif est l'obtention d'un **pool de données quantitatives standardisées**.

### **3-E-3- Quand le système perd les pédales**

De la robustesse des réseaux naît leur **fragilité** (le revers de la médaille). En effet, en acquérant la capacité à répondre aux perturbations habituelles, ils deviennent plus vulnérables à celles provenant de sources inattendues. Les composants affectés définissent les **points de fragilité du système** et, dans le cas des systèmes biologiques, ce sont ceux que l'on retrouve impliqués dans les pathologies.

Dans le cas de la signalisation issue des RTK, **la cible première des dérégulations est le récepteur lui-même**. Les RTK sont pour la plupart des proto-oncogènes dans la mesure où leur dérégulation peut conduire à la transformation cellulaire via une signalisation oncogénique. Ce point est détaillé dans la [partie suivante](#).

De part leur implication dans l'oncogenèse, ils sont naturellement les premières cibles des thérapies anti-cancéreuses. Néanmoins, de part les propriétés décrites précédemment, on sait que la conséquence de la robustesse du système est l'adaptabilité et le développement des résistances ([voir discussion](#)).

La **modélisation** de ces nouveaux réseaux, c'est-à-dire **des réseaux oncogéniques**, pourrait permettre de repérer simultanément plusieurs noeuds de fragilité du système et d'envisager une combinaison thérapeutique visant à l'élimination rapide et totale des cellules cancéreuses. La compréhension de mécanismes généraux ou émergents de la signalisation intracellulaire par des formes oncogéniques pourrait donc ouvrir des **perspectives thérapeutiques majeures**.

## **Partie 4 : Pathologie de la voie SCF/KIT, implication dans les néoplasies**

### **4-A- Le cancer, une maladie génétique**

Le terme de « **cancer** » désigne en réalité un groupe de maladies qui affecte des tissus différents de l'organisme animal (chez l'homme, il existe une centaines de cancers différents décrits). Les cancers dérivants de cellules épithéliales sont appelées carcinomes (ils représentent 85% des cancers), ceux provenant des cellules mésodermiques sont appelés sarcomes, ceux dérivant des cellules glandulaires sont des adénocarcinomes et enfin les cancers issues des cellules du tissu hématopoïétique sont appelées leucémies.

A l'**échelle cellulaire**, le cancer est une **maladie génétique** caractérisée par des altérations de l'ADN. Ces altérations vont de simples mutations à des aberrations chromosomiques larges comme des délétions ou des translocations chromosomiques. Certaines mutations germinales prédisposent à la transformation cellulaire et donnent naissance à des formes familiales de cancer.

L'accumulation des mutations somatiques a lieu par étapes durant la **transformation cellulaire**. La progression tumorale a lieu selon un processus évolutif conforme à la théorie Darwinienne de l'évolution. Les mutations sont sélectionnées les unes après les autres pour leur capacité à conférer un avantage à la cellule tumorale.

En 2000 R. Weinberg et D. Hanahan ont suggéré que ces avantages puissent être classées en six grandes propriétés caractéristiques de presque toutes les cellules cancéreuses – « **The hallmarks of cancer** »<sup>308</sup> (Figure 23) .

Ces propriétés acquises durant le développement tumoral sont:

- (i) l'indépendance vis-à-vis des signaux de croissance
- (ii) l'insensibilité aux signaux inhibiteurs de croissance
- (iii) l'abolition de l'apoptose ou mort cellulaire programmée.
- (iv) une capacité proliférative illimitée
- (v) une capacité de susciter l'angiogénèse.
- (vi) l'acquisition d'un pouvoir invasif.

Aujourd'hui deux nouvelles caractéristiques sont ajoutées :

(vii) l'échappement au système immunitaire <sup>309</sup>

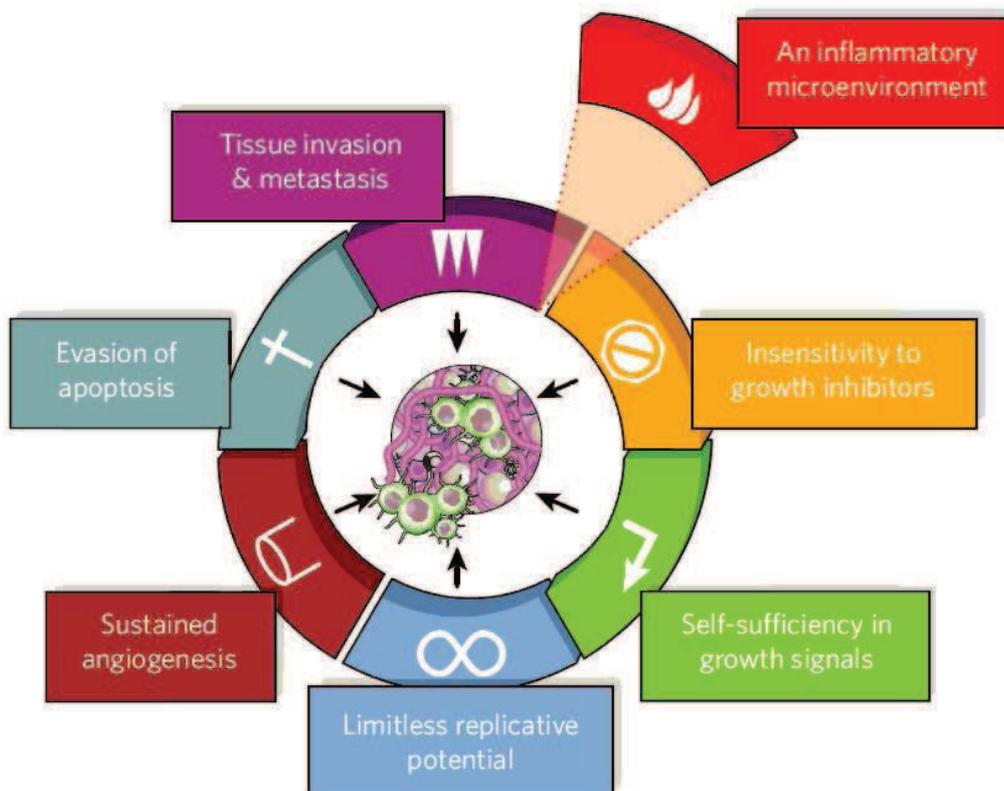
(viii) une reprogrammation métabolique <sup>310</sup>

### Figure 23 : Propriétés acquises par les cellules cancéreuses

Bien que les modalités ou les stratégies puissent être variables, la plupart des cellules cancéreuses acquièrent des propriétés fonctionnelles communes durant le processus de transformation cellulaire.

Le schéma du modèle initial de Hanahan et Weinberg comporte six propriétés : (1) Indépendance vis à vis des signaux de prolifération provenant de l'environnement, (2) Insensibilité aux signaux anti-prolifératifs, (3) Potentiel réplcatif illimité (perte de la sénescence), (4) Capacité à induire l'angiogénèse, (5) Résistance à l'apoptose, (6) Capacité d'invasion tissulaire et de diffusion métastatique.

En 2009, Montovani <sup>309</sup>, reprend le schéma initial et y ajoute la propriété d'un environnement tumoral anti-inflammatoire.



## **4-B- Oncogènes et gènes suppresseurs de tumeurs dans la fonction de prolifération**

Quelque soit le type de cancer considéré, leucémies ou tumeurs solides malignes, une des caractéristiques majeure des cellules cancéreuses est leur **croissance incontrôlée**. Cette croissance incontrôlée est relative à l'acquisition de l'une ou plusieurs des trois premières caractéristiques des cellules cancéreuses décrites par Weinberg et a pour conséquence une perturbation de l'homéostasie tissulaire conduisant au développement de tumeurs/néoplasies bénignes ou malignes. Dans le cas des **leucémies**, les mutations qui affectent les fonctions de prolifération/survie sont dites mutations de **classe I**. Les RTK oncogéniques font partie de ce groupe. Les cellules leucémiques portent en général une mutation de classe I et une mutation de **classe II**. Les mutations de classe II affectent la différenciation cellulaire <sup>311</sup>.

Les gènes impliqués dans la pousse tumorale sont classés en oncogènes et gènes suppresseurs de tumeurs en fonction de leur activité physiologique normale. Un proto-oncogène (la contre-partie « normale » de l'oncogène) est un gène qui, dans les conditions physiologiques, fonctionne comme un **régulateur positif de la croissance** alors qu'un gène suppresseur de tumeur est un **régulateur négatif**. La prolifération anormale peut résulter à la fois du **gain de fonction** d'un proto-oncogène qui devient alors un **oncogène** et/ou de la **perte de fonction** d'un gène suppresseur de tumeur.

Cette notion d'**oncogène** et de **gènes suppresseurs de tumeurs** est applicable à d'**autres fonctions** impliquées dans le processus de transformation cellulaire telles que la fonction de réparation de l'ADN ou la fonction migratoire. Ces aspects sont en dehors du contexte de ce travail et ne seront pas détaillés. Il est à noter cependant que des données parfois contradictoires existent sur certaines tyrosine kinases. C'est le cas par exemple pour la kinase SYK, qui est à la fois renseignée comme oncogène et gène suppresseur de tumeur.

L'activation de SYK est oncogénique dans des cellules de leucémie lymphoïde chronique (CLL) <sup>312 313</sup>. Mais la kinase SYK est un suppresseur de tumeur

dans les adénocarcinomes pancréatiques<sup>314</sup>, les mélanomes<sup>315 316</sup> et les cancers du sein<sup>317 318</sup>.

Cet exemple montre l'importance de la **fonction considérée**. Par exemple ici, SYK est généralement un gène suppresseur de tumeur dans la fonction de migration et plutôt un oncogène dans la fonction de prolifération. Sa fonction dans un cancer donnée pourrait dépendre de l'étape du processus de transformation cellulaire au cours de laquelle sa mutation confère un avantage à la cellule tumorale.

Cet exemple souligne aussi l'importance du **contexte cellulaire**, ici en particulier il existe une différence majeure entre l'implication de SYK dans les cancers d'origine hématopoïétiques et non hématopoïétiques. Le **stade de différenciation** de la cellule touchée pourrait aussi avoir un rôle majeur.

KIT est un proto-oncogène cellulaire, propriété que nous allons développer dans la suite de cette partie. Cependant des expériences de carcinogénèse expérimentale dans les souris *Wv* ont révélé la fonction « gène suppresseur de tumeur » de KIT dans le cas du développement de mélanomes<sup>319</sup> et de cancers du sein<sup>320</sup>. Dans ces exemples cependant, l'effet pourrait être **non autonome cellulaire** c'est-à-dire dépendant de la perte d'expression de KIT par des cellules de l'environnement tumoral comme les mastocytes et/ou les cellules NK/T.

Cet exemple illustre un concept général de l'importance du microenvironnement sur la progression tumorale qui ne sera pas détaillé dans cette thèse mais fait l'objet de recherches actives aujourd'hui.

Ainsi, même si les notions d'oncogènes et de gènes suppresseurs de tumeurs doivent donc être maniées avec précaution, on peut cependant dire que, de manière générale, les tyrosines kinases (cytoplasmiques ou récepteurs), de part leur implication dans le contrôle de l'homéostasie cellulaire, sont des proto-oncogènes cellulaires. La suite de ce paragraphe est dédiée à la description des mécanismes responsables de l'activation oncogénique des récepteurs à activité tyrosine kinase (RTK).

## **4-C- Les mécanismes d'activation oncogéniques des tyrosine kinases**

Les **mécanismes par lesquels les proto-oncogènes peuvent être convertis en oncogènes sont de nature quantitative ou qualitative**. Les modifications quantitatives résultent de l'expression augmentée d'un proto-oncogène dans un type cellulaire donné ou de son expression anormale dans un autre type cellulaire. Les modifications qualitatives sont liées à l'acquisition de nouvelles propriétés par le proto-oncogène et résultent généralement de modifications de la séquence nucléotidique.

Dans le cas de kinases, les formes oncogéniques sont des formes **constitutivement actives**, qui ne sont plus soumises aux mécanismes de contrôles physiologiques. On parle de mutations **gain de fonction**.

Ce paragraphe aborde une description détaillée des mécanismes généraux d'activation oncogénique, documentée à l'aide d'exemples sur KIT et les pathologies associées lorsque que cela est possible.

### **4-C-1- Modifications quantitatives**

Les mécanismes généraux pouvant amener à la conversion des formes normales aux formes oncogéniques peuvent être de **nature quantitative**. En général, les modifications quantitatives du taux d'expression d'une kinase peuvent provenir:

- (i) d'une amplification génique** qui conduit à l'augmentation du nombre de gènes
- (ii) de mutations ponctuelles/délétions dans une séquence régulatrice** qui affectent le niveau d'expression de la kinase.
- (iii) d'une mutagenèse insertionnelle** mettant le proto-oncogène sous contrôle d'une nouvelle séquence régulatrice et conduisant à une expression soit illégitime soit augmentée.

#### 4-C-1-1- Amplification génique

L'augmentation de la production d'un **RTK** mais aussi de son **ligand** peuvent conduire à une activation constitutive du récepteur.

##### **a- Amplification de KIT**

L'**amplification génique** des RTK est fréquemment rencontrée dans les cancers.

Par exemple, l'amplification de ERBB2 est observée dans 20 à 30% des cas de cancer du sein <sup>321</sup> et est aujourd'hui la première cible des thérapies anti-cancéreuses ciblées.

*Pour une revue bibliographique sur le rôle de ERBB2 dans l'oncogénèse, consulter par exemple la référence <sup>322</sup>, et pour une revue bibliographique présentant un bilan après dix ans de thérapeutique ciblée dans les cancers du sein, consulter par exemple la référence <sup>323</sup>.*

Dans le cas de KIT, l'amplification du gène a été mise en cause dans les cas de mélanomes.

Dans une étude récente, il est décrit qu'environ 20% des mélanomes primaires présentent une augmentation du nombre de copies de KIT, et ce sous forme mutée ou non <sup>324</sup>.

##### **b- Stimulation autocrine de la voie SCF/KIT dans les tumeurs solides**

L'hypersécrétion de SCF conduisant à une activation autocrine et/ou paracrine constitutive de KIT est documentée dans différentes tumeurs solides.

Dans les **cancers de la prostate**, l'analyse d'hyperplasies bénignes et d'adénocarcinomes par immunohistochimie et hybridation in situ avec des sondes ARN suivie d'une quantification par RT-PCR révèle la présence de KIT et de SCF dans 40% des tumeurs analysées <sup>325</sup>. Cette co-expression est absente des tissus normaux suggérant l'implication d'une boucle paracrine dans la prolifération des cellules cancéreuses.

Une analyse par immunohistochimie a révélé 35% de cellules positives dans des échantillons de **cancers pancréatiques**, et l'étude de lignées de cancer

pancréatiques KIT-positives montre que la voie SCF-KIT est responsable d'une augmentation de la prolifération et de l'invasivité des cellules <sup>326</sup>.

Des tumeurs primaires de **cancers gynécologiques** co-expriment KIT et le SCF <sup>327</sup>. Caceres-Cortes et al ont réussi à établir deux lignées de cancer du col de l'utérus, exprimant toutes les deux le SCF et KIT. De manière intéressante, l'étude montre spécifiquement une expression du SCF membranaire et souligne l'importance de la densité cellulaire pour la croissance optimale de ces lignées. L'extinction de l'expression du SCF montre son implication dans la survie cellulaire, un rôle qui pourrait s'exercer de manière juxtacrine, plutôt qu'autocrine <sup>328</sup>.

En RT-PCR, 45% des échantillons de **neuroblastomes** humains co-expriment le SCF et KIT. KIT a un rôle essentiel dans la prolifération de lignées <sup>329</sup> via une sécrétion autocrine qui protégerait de l'apoptose <sup>330</sup>.

Dans les **cancers du poumon**, le sous type des cancers à petites cellules (SCLC) exprime KIT à 80%, par opposition aux autres types qui sont négatifs <sup>331</sup>. La prolifération de lignées de neuroblastomes et de lignées de SCLC est inhibée par le STI571, un inhibiteur de KIT <sup>332 333</sup>. Ceci démontre le rôle du couple dans la prolifération des tumeurs positives et ouvre des perspectives thérapeutiques fondamentales. Enfin, une étude récente révèle une co-expression de KIT et du SCF dans 21/36 cas de **GIST** étudiés et une corrélation positive avec le groupe à haut risque <sup>334</sup>. Là encore il s'agit de SCF membranaire. Bien que 85 à 90% des GIST présentent des mutations dans KIT (voir paragraphe suivant), certaines présentent un récepteur sauvage ; la boucle juxtacrine de stimulation de la voie SCF/KIT pourrait donc être impliquée dans la pathologie.

*Pour un article de revue sur l'expression de KIT dans les tumeurs humaines, consulter la référence <sup>335</sup>.*

#### 4-C-1-2- Altération de la régulation au niveau génique

L'exemple le mieux documenté de **mutagenèse insertionnelle** est celui de la translocation du facteur de transcription c-myc le positionnant sous le contrôle du promoteur fort des immunoglobulines (translocation entre les chromosomes 8 et 14 ;

t(8;14)(q24;q32)). Cette translocation est médiée par le virus d'Epstein-Barr (EBV) et est impliquée dans la quasi-totalité des lymphomes de Burkitt endémiques.

*Pour des articles de revue sur le sujet, consulter les références* <sup>336 337 338</sup>.

## **4-C-2- Modifications qualitatives**

Les mécanismes généraux pouvant amener à la conversion des formes normales aux formes oncogéniques peuvent être de **nature qualitative**.

En général, les modifications qualitatives de l'activité de la kinase peuvent provenir :

(i) de mutations ponctuelles/délétions dans la séquence codante qui affectent les **mécanismes d'autocontrôle de l'activité kinase**

(ii) de mutations dans des séquences codantes de protéines impliquées dans la **régulation négative de l'activité kinase**

(iii) des translocations chromosomiques qui aboutissent à la création d'une **protéine de fusion qui acquiert de nouvelles fonctions**

### **4-C-2-1- Création d'une protéine de fusion par translocations chromosomiques**

Les **translocations chromosomiques** qui affectent les gènes codant les tyrosine kinases génèrent des **protéines de fusions** dans lesquelles le domaine catalytique entier de la kinase est fusionné à un partenaire protéique. Les partenaires n'ont pas d'homologie de séquence ou de fonction mais ont au moins deux points communs. Tout d'abord, il existe dans les partenaires des domaines spécifiques d'interactions homotypiques qui sont responsables d'une dimérisation/oligomérisation de la kinase conduisant à son activation constitutive. De plus, dans le cas des leucémies, étant donné que les éléments régulateurs de l'expression du partenaire contrôlent l'expression de la protéine de fusion, les partenaires sont tous normalement exprimés dans le compartiment hématopoïétique. En réalité, ce sont souvent des protéines ubiquitaires.

La plupart du temps, les partenaires ne semblent pas jouer un rôle dans le processus pathologique. Exception faite du cas de BCR dans la fusion BCR-Abl où la

tyrosine 177 de BCR est impliquée dans le recrutement de GRB2 et semble jouer un rôle fondamental dans la transformation <sup>339</sup>.

**Dans les hémopathies**, les RTK PDGFR, FGFR1 et ALK sont les cibles les plus courantes des translocations chromosomiques.

*Pour des articles de revue sur le thème, consulter les références <sup>340 341</sup>.*

Concernant l'activation de la kinase PDGFR, quelque soit la protéine de fusion TEL(ETV6)-PDGFR $\beta$ , HIP1-PDGFR $\beta$ , H4-PDGFR $\beta$ , RAB5-PDGFR $\beta$ , les pathologies sont globalement identiques et consistent en des leucémies chroniques myéloïdes (CML) ou myélomonocytiques (CMML), soulignant le rôle accessoire du partenaire dans le développement pathologique.

De la même manière, même si la fusion NPM-ALK est la plus courante (impliquée dans 70% à 80% des cas) dans les lymphomes anaplasiques à larges cellules (ALCL : anaplastic large cell lymphoma), d'autres partenaires de fusion sont impliqués dans les 20% de cas restants et ne semblent pas modifier le tableau clinique <sup>341</sup>.

Aucune translocation impliquant KIT n'a été décrite.

#### 4-C-2-2- Mutations affectant les mécanismes d'autocontrôle de l'activité kinase

Des mutations affectant la **séquence codante** des RTK peuvent être à l'origine d'une **activation incontrôlée des récepteurs**. Comme décrit dans le [paragraphe 3-C](#), de nombreux mécanismes d'autocontrôle assurent le maintien de la kinase dans un état inactif en l'absence d'activation physiologique par le SCF. Ces points de contrôle sont tous des cibles potentielles pour les mutations oncogéniques. Les mutations qui affectent l'activité kinase de KIT sont classées en mutations de type **régulatrices** et mutations de type **catalytiques (ou enzymatiques)** <sup>342</sup>. Les mutations catalytiques sont localisées dans le domaine kinase et sont décrites au [paragraphe c](#); les autres sont situées à l'extérieur et sont abordées aux [paragraphe a et b](#).

### **a- Mutations affectant la dimérisation**

A la membrane, il existe un équilibre entre les formes actives et inactives des RTK, largement en faveur des monomères inactifs en l'absence de ligand. Par conséquent, même si les récepteurs dimérisés actifs induisent une signalisation, le nombre de complexes engagés est très faible et la transduction est en deçà du seuil requis pour induire une signalisation efficace et une réponse biologique. Dans les conditions normales, c'est la fixation du ligand qui induit le déplacement de l'équilibre vers les formes dimériques activées.

On distingue **deux types de mutations**, celles qui induisent une **dimérisation constitutive** du récepteur en l'absence de ligand et celles qui **déplacent l'équilibre** en faveur des formes activées en l'absence de ligand.

Des mutations conduisant à la **dimérisation constitutive** des RTK affectent souvent des cystéines. Il peut s'agir soit de substitutions faisant apparaître une cystéine soit de délétions conduisant à la perte d'une cystéine dans le domaine extracellulaire. Dans les deux cas, la dimérisation constitutive et l'activation consécutive du RTK proviennent de la création d'un pont disulfure intermoléculaire entre deux monomères.

Dans le premier cas, le pont disulfure apparaît *de novo*.

Un exemple d'une telle substitution est décrit dans FGFR3. La mutation R248C est retrouvée dans les dysplasies thanatophoriques ([détaillé partie 5-A-2-1](#)). Dans le deuxième cas, c'est la perte d'une cystéine normalement impliquée dans la création d'un pont disulfure intramoléculaire avec une autre cystéine proche qui conduit à la création d'un pont disulfure intermoléculaire.

C'est le cas par exemple de la mutation MEN2A (C634S) de RET ([détaillé partie 5-B-1-2](#)).

A notre connaissance, ce type de mutation n'est pas documenté pour KIT.

Par contre, il existe de nombreuses mutations conduisant **au déplacement de l'équilibre en faveur des formes actives du récepteur** qui sont majoritairement retrouvées dans les GISTs et la mastocytose pédiatrique. Certaines de ces mutations sont localisées sur une représentation de surface du domaine D5 de KIT en [figure 24](#) extraite de <sup>104</sup>.

Les domaines impliqués dans la dimérisation de KIT sont les domaines D4 et D5, codés respectivement par les exons 6 à 7 et exons 8 à 9.

Des mutations dans l'exon 9, conduisant à la duplication du motif Ala501Tyr502 ont été initialement décrites dans les **GISTs**<sup>343</sup>. Cette duplication s'accompagne d'une activation constitutive du récepteur lorsque ce mutant est introduit dans des cellules 293T<sup>344</sup>. Ces mutations représentent 10 à 20% des mutations de KIT dans les GIST et sont préférentiellement associées aux tumeurs de l'intestin grêle (95%)<sup>345</sup>.

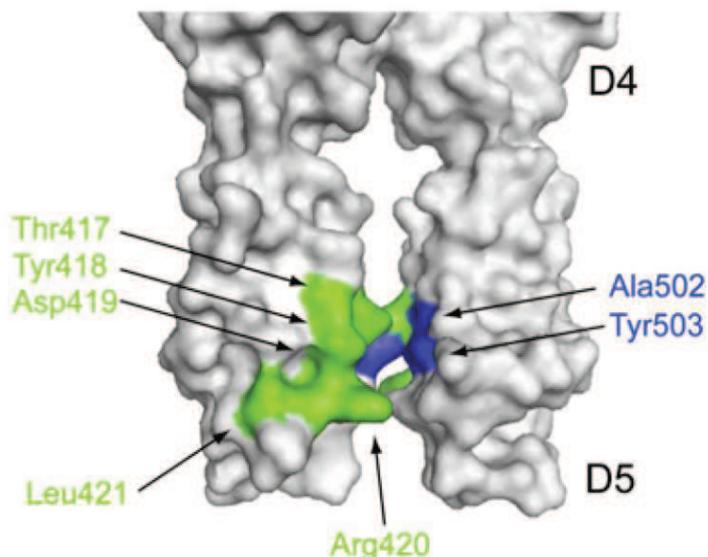
Une étude dans des échantillons **d'AML pédiatriques** a révélé la présence de mutations dans l'exon 8, majoritairement des délétions des acides aminés 417 à 419. Dans cette étude l'exon 9 n'a pas été séquencé<sup>346</sup>.

Grâce au séquençage de KIT chez des patients atteints de **mastocytose pédiatrique**, notre équipe a pu décrire cette même duplication dans des cas de mastocytose. Par ailleurs une autre mutation a été décrite dans l'exon 9, la substitution K509I, ainsi que de nombreuses mutations dans l'exon 8, les deux exons codant le domaine D5 de KIT. Sur les 50 patients analysées, 44% présentaient des mutations dans les exons 8 et 9<sup>347</sup>. Toutes ces mutations, introduites dans des cellules COS, sont responsables d'une activation constitutive du récepteur.

Comme présenté [dans le paragraphe 2-B-1](#), les domaines D4 et D5 jouent un rôle fondamental dans la répulsion des monomères de KIT non activés<sup>104</sup>. Bien que le mécanisme moléculaire précis ne soit pas démontré, les mutations affectant D5 seraient à l'origine d'une augmentation des interactions homotypiques entre deux monomères inactifs, ayant pour conséquence le déplacement de l'équilibre des formes du récepteur en faveur des formes actives. Ainsi, la probabilité de déclencher une signalisation efficace devient plus grande et par ailleurs après stimulation, le seuil de stimulation est plus rapidement atteint.

### Figure 24 : Visualisation des mutations du domaine D5 de KIT impliquées dans les cancers

Représentation de surface des domaines D4 et D5 de KIT dimérique (gris) sur laquelle sont indiquées les positions des acides aminés responsables d'un gain de fonction de l'activité kinase du récepteur et impliqués dans des pathologies. Ala502 et Tyr503 dupliqués dans les GIST et les mastocytoses pédiatriques



sont en bleu, des délétions ou insertions à proximité de Asp419 décrites dans des AML, les SCLC et les mastocytoses pédiatriques sont visualisées en vert. On note que toutes ces positions sont confinées dans l'interface D5-D5.

Un mécanisme similaire est documenté dans le cas de FGFR3<sup>348</sup> et sera développé dans la partie suivante.

#### b- Mutations affectant l'autorégulation conformationnelle du récepteur

Les récepteurs de classe III possèdent un domaine JM auto-inhibiteur conformationnel. Ce domaine agit en cis pour maintenir les RTK dans une conformation inactive. La libération du domaine JM suite à sa phosphorylation est la première étape permettant la transition vers des récepteurs pleinement actifs ([Voir paragraphe 2-B-3](#)). Des **mutations dans le domaine JM** sont largement décrites dans l'activation oncogénique de KIT et FLT3.

L'exemple de FLT3 est parlant sur l'importance que requièrent ces mutations.

FLT3 est le gène le plus fréquemment muté dans les AML et l'altération la plus fréquemment rencontrée (30%) est une duplication en tandem dans le domaine JM (FLT3-ITD) ayant pour conséquence l'activation constitutive du récepteur.

*Pour des articles de revue sur l'implication de FLT3 dans les hémopathies,, consulter par exemple les références <sup>349 350 351</sup>.*

Des mutations dans l'exon 11 de KIT (codant le domaine JM) sont à l'origine de la déstabilisation de la structure de ce domaine et conduisent à une activation constitutive du récepteur in vitro <sup>108</sup> et sans doute in vivo.

Dans une étude princeps, Hirota et al ont non seulement décrit l'expression de KIT dans les **GISTs**, mais aussi la présence de mutations activatrices dans l'exon 11 <sup>352</sup>. Le séquençage systématique des GISTs a révélé que des mutations dans l'exon 11 sont retrouvées dans 60 à 70% des tumeurs avec majoritairement des délétions ou insertions affectant la première partie de l'exon qui code les acides aminés 557 à 559 <sup>345</sup>.

Plus récemment, l'analyse de KIT dans des échantillons de **mélanomes primaires** a révélé la présence de mutations dans le domaine JM <sup>324</sup>.

L'obtention de la structure cristallographique de la kinase dans la conformation inactive a révélé le repliement en épingle à cheveux du domaine JM à l'intérieur de la fente catalytique <sup>105 107</sup>. Plusieurs interactions stabilisent cette conformation dont la formation d'un patch hydrophobe par l'interaction des chaînes latérales des valines 559 et 560 du domaine JM avec une surface hydrophobe constituée de val643, tyr646, cys788 et ile789. Les valines 559 et 560 sont les cibles les plus fréquentes des substitutions ponctuelles dans le domaine JM. Des duplications en amont pourraient modifier la longueur de la chaîne et restreindre les interactions dans le patch. Enfin, la mutation germinale K642E (exon 13) qui est associée avec des cas familiaux de GIST pourrait elle aussi perturber ce patch <sup>343</sup>.

D'**autres hypothèses**, en plus du rôle dans la déstabilisation conformationnelle, sont avancées pour expliquer le rôle des mutations dans l'exon 11 de KIT. Ces mutations pourraient conduire à une perte de la régulation négative du signal issu de KIT de part la perte d'interactions avec certains régulateurs négatifs tels que SHP-1, LNK ou APS (recrutement indirect de Cbl) sur le site dityrosine YY568-570. Ces hypothèses n'ont cependant jamais été testées. Vraisemblablement ce phénomène pourrait amplifier l'activation mais ne pourrait à lui seul être responsable de l'activation constitutive du récepteur.

### **c- Mutations affectant l'activité kinase du récepteur**

Les mutations affectant l'**activité kinase** des récepteurs sont des mutations qui stabilisent les kinases dans leur **conformation active**.

Dans le cas de **KIT**, des mutations sont décrites dans la boucle d'activation codée par l'exon 17. Il s'agit des mutations affectant les codons **816** et 825.

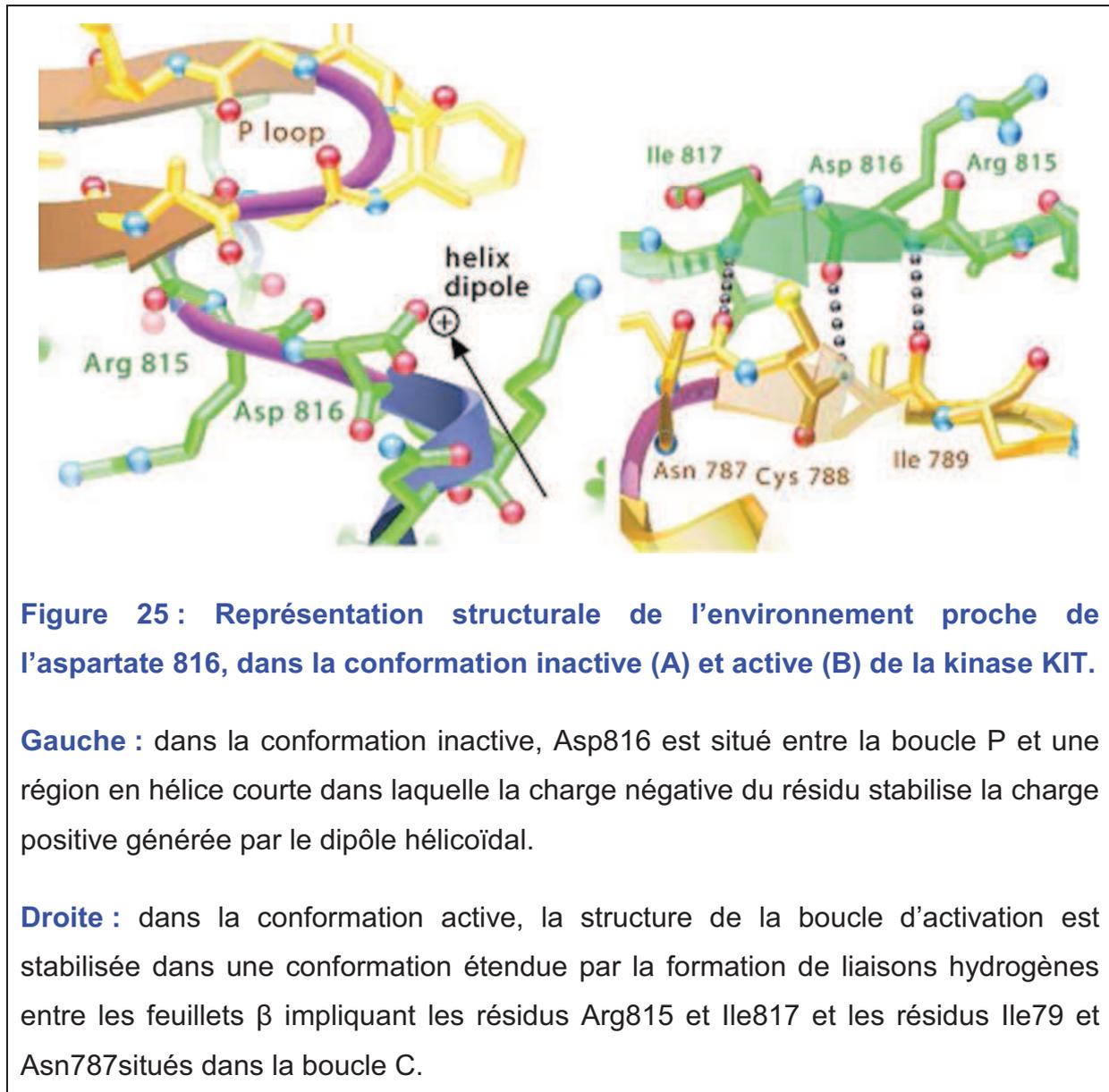
Dans les **lymphomes sinonasaux**, qui sont liés à une hyperplasie du compartiment NK/T, 92% (7/8) des mutations de l'exon 17 se trouve sur le codon 825 <sup>353</sup>.

Dans les **mastocytoses systémiques de l'adulte**, la mutation la plus fréquemment retrouvée (au moins 70% des cas) est la substitution de l'aspartate en position 816 par une valine (D816V, ou D814 dans le contexte murin) <sup>354 355 356</sup>. Les travaux de l'équipe et d'autres ont participé à la mise en évidence du rôle causatif de la mutation dans l'induction d'une différenciation mastocytaire de cellules néoplasiques <sup>357</sup> et l'induction d'une mastocytose chez l'animal <sup>358</sup>.

Des substitutions au niveau du codon 816 ont par ailleurs été décrites dans les **AML** et ce dans 40% des cas (6/15) de patients atteints d'une AML appartenant au sous type CBF (Core Binding Factor) <sup>359 360 361</sup> et dans les **séminomes testiculaires** <sup>362 363 364</sup>.

L'obtention de la **structure cristallographique** de la kinase KIT a permis de mettre en évidence les **conséquences structurales possibles de la mutation D816** et ainsi d'expliquer l'activation constitutive de la kinase qui en découle <sup>107</sup>. Dans la structure active des résidus parfois distants dans la séquence primaire établissent des liaisons particulières qui stabilisent la kinase ([figure 25, droite](#) <sup>107</sup>). C'est le cas par exemple de la tyrosine de la boucle d'activation Y823, qui, lorsqu'elle est phosphorylée établie des liaisons hydrogène avec les arginines 815 et 791. La substitution en position 816 pourrait inverser la conformation du squelette protéique déstabilisant les interactions normales de arg815 dans la structure inactive et conduire à une stabilisation permanente de la boucle d'activation via arg815. Dans la conformation inactive, en vertu de sa charge, l'aspartate 816 stabilise une petite hélice alpha chargée positivement située à sa proximité. L'effet délétère de la mutation pourrait être alternativement lié à la perte de la charge de asp816 et donc

de la stabilisation de la conformation inactive (figure 25, gauche <sup>107</sup>). La conséquence structurale de la mutation du codon 825 n'est pas décrite.



Il est à noter que les mutations de types régulatrices ou enzymatiques ne présentent pas la même sensibilité aux inhibiteurs. En effet, certains inhibiteurs comme le Gleevec (STI571) sont des compétiteurs de l'ATP qui lient la kinase sous forme inactive et stabilisent cette conformation, empêchant ainsi la kinase de passer en conformation active <sup>105 107</sup>. Ces inhibiteurs sont actifs sur les mutants régulateurs mais pas sur les mutants enzymatiques dont la conformation est constitutivement active.

#### 4-C-2-3- Mutations affectant les systèmes de régulation négative de l'activité des kinases

L'échappement aux mécanismes d'atténuation du signal, en particulier à la terminaison médiée par l'endocytose et la dégradation, est fréquemment rencontré dans les cancers dépendants de l'activation constitutive des RTK.

*Pour un article de revue sur le thème, consulter la référence <sup>365</sup>.*

Par exemple, des mutations directes affectant le recrutement de Cbl sont décrites dans le cas de EGFR et MET. Dans EGFR, la substitution de la tyrosine Y1045 empêche le recrutement de Cbl via GRB2 et conduit à une augmentation du pouvoir mitogénique du récepteur qui n'est plus dégradé <sup>366</sup>.

De même, inhiber la dégradation de MET en empêchant le recrutement de Cbl confère des propriétés transformantes au récepteur <sup>367</sup>.

Cependant, cet échappement a plus souvent lieu de manière indirecte (développé dans la partie suivante), voire au niveau de mutations de la protéine Cbl elle-même.

*Pour des articles de revue sur le thème, consulter les références <sup>368 365 369</sup>.*

Le cas des oncogènes viraux est aussi développé dans la partie suivante.

## **Partie 5 : Signalisation oncogénique par les RTK activés**

### **Les mécanismes moléculaires impliqués dans la spécificité de la signalisation oncogénique**

Dans le cas de l'activation des RTK par les facteurs de croissance, il peut exister des situations de **stimulations chroniques** des récepteurs. Cependant cette activation permanente n'entraîne pas une prolifération anarchique des cellules. La signalisation oncogénique, n'est pas équivalente à une stimulation normale qui se prolongerait car elle échappe aux différents mécanismes de régulations négatives physiologiquement enclenchés suite à l'activation normale d'un RTK. Les systèmes de contrôles sont incapables de l'enrayer. Il doit donc exister des **différences moléculaires propres à la signalisation issue des RTK oncogéniques qui permettent de rendre compte de l'échappement à tout contrôle cellulaire.**

C'est sur cette base que l'idée d'une **thérapeutique ciblée** trouve ses fondements et l'élucidation des mécanismes spécifiques aux kinases oncogéniques constitue donc un enjeu thérapeutique majeur. C'est aussi l'une des **thématiques de recherche de notre laboratoire**. Depuis de nombreuses années, l'équipe recherche et caractérise des voies de signalisation différentiellement activées par les formes sauvages et mutées du récepteur KIT.

L'objectif de cette partie est d'étayer par des exemples certaines spécificités de la signalisation oncogénique et d'essayer de dégager les mécanismes moléculaires pouvant rendre compte de cette spécificité.

Les mutations gain de fonction responsables de l'activation constitutive des RTK peuvent avoir des conséquences quantitatives et qualitatives sur l'activité des kinases et sur les voies de signalisation intracellulaire activées en aval. Les **modifications quantitatives** de la signalisation peuvent résulter du défaut d'arrêt de la signalisation ou de la modification du seuil d'activation nécessaire pour obtenir une signalisation productive. Les **modifications qualitatives** quant à elles peuvent résulter de modifications des propriétés catalytiques des RTK oncogéniques ou de leur localisation aberrante. Des exemples sont détaillés et explicités.

## **5-A- Les modifications quantitatives de la signalisation**

### **5-A-1- Modification de la durée de vie de l'activation**

Comme nous l'avons décrit précédemment, la durée de la signalisation dépend de **l'atténuation des signaux** obtenue grâce à l'intervention des **phosphatases**, et de **l'arrêt** obtenu après **endocytose/dégradation** des récepteurs. Dans de nombreuses situations oncogéniques, le signal intracellulaire n'est pas mis au repos, et des signaux normalement émis de manière transitoire deviennent persistants (constitutifs). Il existe de nombreuses stratégies par lesquelles les RTK oncogéniques échappent aux mécanismes de régulation négative.

#### **5-A-1-1- Echappement aux phosphatases**

Un échappement au mécanisme d'atténuation du signal médié par l'action des phosphatases est documenté dans le cas de la PTP SHP1.

En comparant des cellules mastocytaires transduites par KIT sauvage ou KIT<sup>D814Y</sup>, Piao et al ont observé l'absence de la phosphorylation activatrice de SHP-1 mais aussi plus généralement de l'expression de la protéine qui semble dégradée de manière Ub-dépendante dans les cellules KIT<sup>D814Y</sup> <sup>370</sup>.

La question de savoir si cette dégradation dépend directement de l'activité oncogénique de KIT<sup>D814</sup> est ouverte.

Plus généralement, une analyse globale par puces à ARN et quantification successive par RT-PCR a révélé une diminution significative de l'expression de SHP1 dans des lignées de lymphomes NK/T. L'analyse immunohistochimique sur TMA (Tissu MicroArray) de 200 échantillons congelés révèle que 100% des lymphomes NK/T testés et 95% des échantillons de lymphomes divers sont négatifs pour l'expression protéique de SHP1 <sup>371</sup>. Une analyse ultérieure de différents lymphomes et leucémies révèle une hyperméthylation du promoteur de SHP1 <sup>372</sup>.

De la même manière, la question de savoir si l'hyperméthylation du promoteur de SHP1 dépend directement de l'activité oncogénique des tyrosines kinases activées dans les différents échantillons testés est ouverte. Il pourrait en effet s'agir de la conséquence de mutations secondaires.

De manière intéressante, l'activité de KIT a déjà été impliquée dans le contrôle épigénétique de l'expression des protéines MAGE via le contrôle de l'état de méthylation du promoteur<sup>373</sup>.

### 5-A-1-2- Echappement aux mécanismes d'endocytose et de dégradation

Comme mentionné précédemment (paragraphe 3-C-3-2), la famille Cbl joue un rôle majeur dans l'ubiquitination des RTK et leur direction vers la dégradation dans les lysosomes.

Les oncogènes les plus efficaces pour éviter l'action de Cbl ne sont autres que les premiers oncogènes découverts, à savoir les oncogènes viraux.

#### **a- A propos des oncogènes viraux**

Les études sur les rétrovirus constituent les fondations des recherches sur la biologie du cancer. En 1911, Peyton Rous isole d'un sarcome de poulet un filtrat acellulaire capable de transmettre le cancer à un autre animal. Il s'agit du virus de sarcome de Rous. Des dizaines d'années plus tard, on découvre que la transformation par le virus est liée à la présence d'un gène supplémentaire, non requis pour la multiplication virale. Ainsi est décrit le premier oncogène, v-src. En 1976, Varmus et Bishop établissent qu'il existe chez le poulet non infecté un homologue de v-src. Ainsi est décrit le premier proto-oncogène, c-src, contrepartie cellulaire normale de l'oncogène viral. Les travaux de Varmus et Bishop ont permis d'établir que la plupart des oncogènes alors décrits étaient des formes altérées de proto-oncogènes cellulaires. Ces travaux, à l'origine de la biologie moléculaire du cancer furent couronnés du Prix Nobel de Médecine en 1989.

Beaucoup de PTK ont des dérivés oncogéniques viraux, les RTK ne faisant pas exception. Ainsi pour les membres de la classe III par exemple, il existe v-Fms et v-Kit.

L'une des rares différences entre c-Fms et **v-Fms** est une délétion de 50 acides aminés en position C-terminale qui fait perdre la tyrosine 969 impliquée dans le recrutement de Cbl. Ainsi v-Fms est réfractaire à l'ubiquitination médiée par Cbl et si l'on fusionne à v-Fms un site de recrutement du domaine TKB de Cbl on diminue son pouvoir transformant<sup>374</sup>.

De la même manière, dans **v-Kit**, les deux tyrosines décrites dans l'interaction avec Cbl, Y568 et Y936 sont absentes.

A posteriori, l'observation des formes oncogéniques virales semble systématiquement montrer la perte de tyrosines essentielles au recrutement de Cbl.

*Pour un article de revue sur le thème, consulter la référence <sup>375</sup>.*

De manière réciproque, v-cbl est incapable d'exercer sa fonction d'E3-ubiquitine ligase par la délétion de son domaine RING, et agit comme un oncogène, sans doute indirectement via le défaut de régulation des signaux RTK.

### **b- Le cas des protéines de fusion**

Dans le cas des protéines de fusion résultant des translocations chromosomiques, les « nouvelles TK » ne sont plus membranaires. De manière assez triviale, elles échappent alors au contrôle physiologique de leur régulation qui implique une ubiquitination par Cbl et un recrutement dans les CCPs membranaires.

Par exemple il est décrit que TEL-PDGFRbeta et FIP1L1-PDGFRalpha échappent à l'ubiquitination et que la restauration de leur dégradation diminue considérablement leur pouvoir mitogénique <sup>376</sup>.

L'échappement à la dégradation participe donc à la transformation.

Les fusions Rab5-PDGFR et HIP1-PDGFR sont très intéressantes à ce titre. En effet les deux protéines partenaires sont elles-mêmes impliquées dans la machinerie d'endocytose et la fusion pourrait induire une perturbation générale de la régulation d'autres RTK et conduire ainsi à une amplification de l'oncogenèse, de « super-oncogènes » en quelque sorte. Cette idée est en accord avec l'activité oncogénique de la surexpression de HIP1 décrite dans de multiples tumeurs épithéliales <sup>377</sup>. Ceci pourrait avoir comme conséquence une diminution du nombre d'altérations nécessaires à la transformation cellulaire des cellules portant ces translocations. Bien sur ce ne sont encore que des hypothèses.

Il est à noter que dans le cas des protéines de fusion, l'échappement à la dégradation est certainement lié à la localisation aberrante de la kinase oncogénique

et ce point pourrait donc être développé dans le paragraphe 5-B-2 consacré à ce sujet.

**Ainsi, il apparaît que l'échappement aux mécanismes de terminaison médiés par Cbl, l'internalisation et la dégradation successive soit un thème récurrent de la transformation oncogénique.**

## **5-A-2- Modification du seuil d'activation**

### 5-A-2-1- Activation et pouvoir transformant des RTK : mise en évidence d'un effet dose

L'existence d'une corrélation entre le pouvoir tumorigène et le niveau d'activation des RTK oncogéniques a été illustrée dans de nombreuses études.

C'est le cas pour le RTK **MET**...

L'effet transformant de différentes mutations de MET trouvées dans des carcinomes papillaires rénaux a été comparé *in vitro*. Cette étude montre qu'il existe une corrélation entre le niveau de phosphorylation du récepteur (c'est-à-dire de son activation), la formation de foci et la tumorigénicité dans des souris nude. De manière intéressante, les mutations germinales conduisent à des GOF globalement moins actifs que les mutations somatiques<sup>378</sup>.

... et aussi pour le RTK **FGFR3**.

Chez l'homme, on distingue deux formes de nanisme dites nanisme proportionné ou disproportionné en fonction des dysmorphies engendrées. Les nanismes disproportionnés sont les plus fréquents et résultent de troubles de la croissance osseuse et cartilagineuse longitudinale. Dans cette classe, il existe trois formes cliniquement reliées qui sont de sévérité croissante : l'hypochondroplasie (HCH ; raccourcissement surtout de la racine des membres), l'achondroplasie (ACH ; raccourcissement de la racine des membres et visage caractéristique ; c'est la forme la plus fréquente) et la dysplasie thanatophorique de type II (TDII), forme sévère de nanisme avec une mortalité néonatale. Ce sont toutes trois des maladies congénitales autosomales dominantes, causées par des mutations ponctuelles distinctes dans le récepteur FGFR3. La mutation majoritaire dans les ACH est localisée dans le domaine extracellulaire (G380R), tandis que les mutations dans les

TDII sont dans le domaine kinase (K650E, majoritaire) ou dans l'ectodomaine (R248C).

Naski et al ont réalisé une étude comparative du pouvoir activateur de ces trois substitutions de FGFR3 en analysant d'une part leur niveau de phosphorylation et d'autre part leur capacité à soutenir la prolifération indépendante de cytokines de cellules Ba/F3<sup>348</sup>. Le mutant G380R ne montre pas d'activation constitutive dans les cellules Ba/F3 mais c'est le cas en surexpression dans des cellules NIH3T3. Il a un faible mais reproductible pouvoir mitogénique. Le mutant R248C montre une activation constitutive du récepteur et confère une prolifération indépendante de cytokine aux cellules Ba/F3. Le mutant K650E est un GOF dont l'activité peut-être stimulée par le ligand et lui aussi soutient la pousse des Ba/F3.

**Ainsi, il existe une corrélation directe entre le degré d'activation du récepteur et la sévérité de la maladie.**

Dans le cas de **KIT**, l'équipe a décrit l'existence de nouvelles mutations dans le domaine D5 de KIT chez des patients atteints de mastocytose pédiatrique.

Les mutations ITD502-503 et K509I sont des mutations GOF en surexpression dans des cellules COS<sup>347</sup>. Mais, dans des cellules Ba/F3 le niveau d'activation de ces récepteurs mutants est plus faible et semble inférieur au niveau obtenu avec un mutant GOF du domaine kinase tel que le mutant D816V. Enfin dans les cellules Ba/F3, l'activité de ces mutants peut être stimulée par l'ajout de SCF<sup>379</sup>.

### 5-A-2-2- Implications dans la transformation cellulaire

La mutation ACH est une mutation douce qui déplace l'équilibre en faveur des formes actives du récepteur en l'absence de ligand. En conséquence, le seuil nécessaire pour atteindre une signalisation productive est plus rapidement atteint. Ces mutations sont sensibles au niveau d'expression du récepteur, comme le confirme l'activité transformante obtenue *in vitro* après surexpression de la mutation ACH dans des NIH3T3 et *in vivo* le fait que la pathologie associée à l'homozygotie

ACH soit une déficience grave de type TDII. Mais ces mutations sont aussi très sensibles au niveau d'expression du ligand.

Dans le cas de KIT, ce type de mutations est responsable d'une hyperprolifération qui peut-être bénigne, comme dans le cas de la mastocytose. Par exemple l'équipe à montré que dans la mastocytose pédiatrique, 45% des patients atteints présentent des mutations douces de type régulatrices alors que dans la mastocytose adulte les mutations catalytiques sont beaucoup plus fréquentes<sup>347 354</sup>.

Une hypothèse pourrait être que ces mutations « douces » prédisposent à la transformation oncogénique. Ce sont les mutations que l'on retrouve par exemple dans les cas familiaux de GIST. Les cellules porteuses de ces mutations répondent à des quantités sub-optimales de ligand, et on peut imaginer que dans le cas d'une stimulation chronique comme c'est le cas de cellules de Cajal (ICC) et des mastocytes il y ait une augmentation de la fréquence de transformation.

## **5-B- Les modifications qualitatives de la signalisation**

### **5-B-1- Modification des propriétés catalytiques de l'enzyme**

#### **5-B-1-1- Généralités sur la spécificité catalytique des PTK**

La découverte de l'implication majeure des protéines kinases dans la signalisation cellulaire, et la mise en évidence d'exemples suggérant le rôle de la séquence primaire de certains substrats dans la détermination de la spécificité enzymatique, ont inspiré des études à grande échelle visant à déterminer la spécificité de substrat des différentes kinases afin d'identifier leurs cibles biologiques.

En utilisant des bibliothèques orientées de peptides dégénérés, Songyang et al ont ainsi défini les séquences peptidiques préférées de certaines serine/thréonine kinases<sup>380</sup> puis de neuf tyrosine kinases<sup>381</sup>. Cette dernière étude a permis de mettre en évidence une séquence peptidique favorite pour chaque TK testée. La comparaison des séquences peptidiques obtenues avec celle de substrats connus a révélé une excellente corrélation pour plusieurs enzymes. Par ailleurs, alors que certains peptides sont très efficacement phosphorylés par certaines

PTK, il ne le sont peu ou pas par d'autres. C'est le cas par exemple de la phosphorylation des peptides de type YAAP et YGEF par les kinases Abl et SRC respectivement. De manière remarquable, pour les PTK cytoplasmiques, il existe une corrélation entre la séquence du substrat optimal et le motif de reconnaissance favori par leur propre domaine SH2. Pour la kinase FES par exemple, il s'agit de la même séquence Y-E-E-I/V-. Ceci représenterait un double verrouillage de la sélectivité de la signalisation. Les RTK ont en général une préférence pour les motifs de type Tyr-φ-X-φ.

A la fin de cette étude les auteurs suggèrent le rôle critique de la spécificité enzymatique dans la fidélité de la signalisation en aval. En effet, l'analyse comparative du récepteur RET sauvage et du mutant M918T (MEN2B) montre que si le premier phosphoryle préférentiellement des peptides de type EGF, le mutant acquiert la capacité à phosphoryler des peptides de type SRC ou ABL.

De cette étude est née l'idée que la spécificité catalytique des enzymes assure la fidélité de la signalisation et que des mutations pourraient être à l'origine d'un changement de spécificité de substrat des tyrosine kinases oncogéniques, ayant pour conséquence une signalisation altérée et la transformation.

## 5-B-1-2- Spécificité catalytique des RTK oncogéniques

### a- Au niveau du récepteur lui-même

Comme le premier substrat des RTK activés n'est autre que le récepteur lui-même, des études ont comparé le pattern d'autophosphorylation des RTK sauvages par rapport aux RTK mutés.

L'expérience princeps consiste à réaliser des **essais kinase *in vitro*** en présence d'ATP marqué au phosphate radioactif (P32) puis d'analyser les phosphopeptides obtenus après digestion tryptique et migration en 2D. Ce type d'expérience a été réalisé sur des formes activées de **RET**. Des mutations de RET sont impliquées dans des néoplasies endocrines multiples (MEN). Les mutants MEN2A (C634S) et MEN2B (M918T) de RET sont activés constitutivement

par deux mécanismes différents, respectivement dimérisation constitutive et activation de la boucle catalytique, et conduisent à des pathologies presque similaires mais avec une différence de progression et de sévérité <sup>382</sup>.

L'analyse du pattern d'autophosphorylation de ces deux mutants montre que le pattern de phosphorylation du mutant MEN2A est identique à celui du récepteur sauvage <sup>382</sup>. Par contre MEN2B est moins actif et conduit à un profil différent avec disparition d'un phosphopeptide et apparition d'un autre. Le peptide disparaissant contenant un site actif de liaison à GRB2, cette différence pourrait être une des explications moléculaires aux différences fonctionnelles <sup>383</sup>.

Et aussi sur **KIT**.

La comparaison des formes murines de KIT sauvage et KIT<sup>D814Y</sup> révèle aussi une différence du pattern d'autophosphorylation des récepteurs <sup>370</sup>.

Avec la génération d'**anticorps phospho-spécifiques** est apparue la possibilité de comparer directement le profil de phosphorylation des récepteurs par hybridation.

Ainsi, l'équipe de Ronnstrand a pu comparer l'autophosphorylation de huit tyrosines intracellulaires de FLT3 WT stimulé, FLT3-ITD et FLT3<sup>D835Y</sup>. Ils observent des différences qualitatives mais aussi quantitatives (intensité du signal sur une tyrosine donnée). La phosphorylation spécifique de la tyrosine 842 par le mutant D835Y est un résultat convainquant <sup>384</sup>.

La limite de ce genre d'études réside dans la spécificité des anticorps utilisés. La plupart du temps, elle est définie à partir d'un crible négatif qui assure que les anticorps reconnaissent la protéine d'intérêt uniquement lorsque celle-ci est phosphorylée. De plus ces criblages sont souvent réalisés à l'aide de courtes séquences peptidiques contenant la tyrosine cible plutôt que la protéine entière. Dans la plupart des cas, ces anticorps ne sont pas testés contre d'autres cibles et ils peuvent donc reconnaître d'autres phospho-tyrosines que celle annoncée, et ce au sein d'une autre protéine voire de la même. Par exemple, au cours de nos travaux, nous nous sommes procuré l'anticorps spécifique du motif Y568-Y570 de KIT sous forme phosphorylée. A notre grande surprise, lorsque cet anticorps a été utilisé sur des lysats de cellules Ba/F3 exprimant stablement le récepteur muté sur ces deux tyrosines KIT-YY568-570FF, le signal sur le récepteur était toujours présent. De la même manière, nous avons pu constater en western blot que de nombreux anticorps

anti-phospho-tyrosine d'une protéine sont capables de reconnaître d'autres tyrosines phosphorylées. Nous avons pu par exemple observer un marquage systématique de KIT par les anticorps anti-phospho-PLC $\gamma$  ou anti-phospho-FAK. Pour évaluer la phosphorylation de ces protéines à l'aide de ces anticorps, il faut donc dans un premier temps immunoprécipiter les protéines ce qui réduit considérablement l'intérêt de leur utilisation.

Jusqu'ici, une seule étude comparative a été réalisée en **phosphoprotéomique quantitative** sur le récepteur oncogénique FLT3-ITD<sup>385</sup>. Cette étude montre que la tyrosine Y842 de la boucle d'activation de FLT3 n'est pas phosphorylée lorsque FLT3-ITD est retenu dans le ER alors qu'elle l'est au niveau membranaire. Par opposition, la tyrosine 591 présente le même niveau de phosphorylation que le récepteur soit dans le ER ou la membrane. Les auteurs suggèrent qu'une phosphatase serait responsable de la déphosphorylation spécifique de Y842, bien que l'analyse dans des cellules déficientes pour la phosphatase PTP1B résidente du ER ne soit pas concluante.

Nous proposons qu'**une autre hypothèse puisse expliquer ce résultat**. Il est possible que le récepteur bloqué dans le ER soit dans une conformation à demi active. Dans le cas de KIT, il est décrit que la phosphorylation de la tyrosine de la boucle d'activation n'est pas requise pour l'activité kinase bien que celle-ci puisse augmenter la stabilité de la conformation active<sup>107</sup>. On pourrait donc imaginer que les RTK activés dans le ER soient incapables d'atteindre le niveau d'activité maximal. Si on suppose que la phosphorylation de la tyrosine de la boucle d'activation se fait en trans, l'absence de dimérisation des formes activées dans le ER pourrait être une explication. Ainsi les différences entre les signalisations initiées du ER et de la membrane pourraient être liées à une différence d'activité kinase du récepteur lui-même, ce niveau pouvant correspondre à l'activation de voies de signalisation différentes comme nous l'avons décrit plus tôt.

Cette hypothèse pourrait aussi réconcilier des données contradictoires concernant l'activation des STATs par le récepteur FLT3 sauvage. Le résultat dépend peut-être de l'intensité et de la cinétique de la stimulation réalisée.

Dans l'avenir, d'autres analyses comparatives en **phosphoprotéomique quantitative** devraient apporter d'importantes informations sur ce thème. Aujourd'hui en effet, ces techniques permettent l'identification et le suivi dynamique de centaines de sites de phosphorylation *in vivo* à une échelle globale <sup>386</sup>.

### **b- Au niveau des substrats (en aval)**

Si les récepteurs acquièrent de nouvelles propriétés catalytiques sur eux-mêmes, peut être est-ce aussi le cas sur des substrats situés en aval, allant potentiellement même jusqu'à l'apparition de nouvelles cibles.

Dans le cas de KIT, deux études ont abordé cette question.

Dans l'étude de Piao montrant des profils d'autophosphorylation différents pour KIT WT et KIT<sup>D814V</sup>, des tests kinases réalisés sur des peptides substrats de type EGF, ABL ou SRC révèlent que le mutant D814Y est beaucoup plus efficace que KIT WT dans la phosphorylation des peptides de type ABL <sup>370</sup>.

La mutation est donc à l'origine d'un changement global de sélectivité de la kinase.

Dans l'étude biochimique qui démontre l'effet auto-inhibiteur du domaine JM de KIT, les auteurs ont comparé l'activité enzymatique de KIT sauvage et d'un mutant activateur du domaine JM sur différents peptides substrats. Aucune différence n'a été observée sur 5 substrats différents, et le KM ATP des enzymes est identique <sup>108</sup>.

Les mutations du domaine JM ne semblent donc pas affecter la spécificité catalytique de l'enzyme.

### **Comment les mutations peuvent-elles modifier la sélectivité des enzymes envers des substrats ?**

Les mutations « 2B-like » qui substituent une méthionine par une thréonine dans la boucle p+1 des RTK sont retrouvées dans RET (M918T) et MET(M1268T) et sont impliquées dans la transformation cellulaire <sup>382 387</sup>. Introduites dans EGFR ou RON, les mutations « 2B-like » sont transformantes <sup>388 389</sup>. La boucle p+1, située juste après la boucle d'activation serait impliquée dans la reconnaissance du résidu suivant la tyrosine à phosphoryler dans un substrat <sup>390</sup>. Yuan et al ont montré que les mutations 2B s'accompagnent spécifiquement d'une phosphorylation constitutive de

STAT3 et d'un recrutement plus efficace de STAT3 sur RET-2B<sup>391</sup>. STAT3 pourrait donc être une cible du changement de sélectivité des kinases oncogéniques de type 2B.

L'analyse de ces différents exemples nous amène à conclure qu'une **différence de sélectivité catalytique n'a jusqu'ici été décrite que dans le cas de mutations oncogéniques situées dans le domaine kinase**. Ces mutations sont à l'origine de changements conformationnels majeurs dans la boucle catalytique ; en atteste leur résistance aux inhibiteurs ciblant les conformations inactives<sup>392 393</sup>. On pourrait donc envisager que des tyrosines normalement cachées dans la structure deviennent accessibles à la phosphorylation. Ces nouvelles phosphorylations pourraient être à l'origine du recrutement de nouveaux substrats. Autant que nous le sachions, cette dernière hypothèse n'a encore jamais été démontrée. Par ailleurs, si ces mutations se trouvent dans les régions impliquées dans la reconnaissance des substrats (cas des mutations 2B-like), elles peuvent directement modifier la sélectivité catalytique de l'enzyme.

**La question de la contribution du changement de sélectivité enzymatique des RTK oncogéniques dans la transformation cellulaire reste une question ouverte.**

## **5-B-2- Modification de la localisation**

### **Signalisation d'un compartiment anormal**

#### **5-B-2-1- Généralités sur la maturation des glycoprotéines membranaires**

Les protéines membranaires sont des **glycoprotéines**. L'ajout et la maturation des chaînes saccharidiques se fait en plusieurs étapes au cours de la **maturation de la protéine dans le réseau d'adressage membranaire**. La glycosylation est initiée dans le réticulum endoplasmique par transfert d'un précurseur oligosaccharidique pré assemblé sur une asparagine cible du polypeptide naissant située dans un motif Asn-X-Thr/Ser. Cette première chaîne sucrée est un oligosaccharide branché riche en mannose N-lié sur la protéine. La protéine est ensuite transférée dans le Golgi où

une deuxième série de réactions assurent le remaniement du squelette existant et l'ajout de nouveaux résidus carbohydrates aboutissant à la production de glycoprotéines complexes, poly-glycosylées dans la majorité des cas <sup>394</sup>.

Il existe au niveau du réticulum endoplasmique des mécanismes de **contrôle qualité** très stringents qui empêchent le transfert vers le Golgi en cas de repliement incorrect de la protéine <sup>395</sup>. Ces mécanismes font intervenir des cycles d'addition ou d'excision de molécules de glucose, qui constituent des signaux de reconnaissance pour des chaperonnes telles que la calnexine et la calreticuline qui sont capables de retenir les glycoprotéines dont le repliement n'est pas correct <sup>396</sup>. L'accumulation de protéines mal repliées peut engendrer un stress du réticulum endoplasmique et initier une réponse appelée réponse UPR (unfolded protein response) pouvant conduire à la mort cellulaire <sup>397</sup>.

#### 5-B-2-2- Maturation normale des RTK

**Les RTK sont des glycoprotéines membranaires complexes qui mûrent dans le réseau d'adressage membranaire.** Expérimentalement on peut suivre les RTK dans le réseau en fonction de leur poids moléculaire (visible en western-blot) et de leur sensibilité à différents traitements enzymatiques (N-endoglycosidase).

La forme de bas poids moléculaire correspond à la chaîne polypeptidique seule. La forme de poids moléculaire intermédiaire correspond à une forme glycosylée immature riche en mannose résidente du ER. Enfin la forme de haut poids moléculaire correspond à la glycoprotéine membranaire mature. L'endoglycosidase H (EndoH) est uniquement capable de décrocher les oligosaccharides immatures riches en mannose. Sous l'action de l'EndoH, seule la forme résidente du RE est affectée. La peptide N-glycosidase F (PNGaseF) hydrolyse tous les sucres N-liés. Sous son action, les formes matures et intermédiaires sont déglycosylés et conduisent à la forme de bas poids moléculaire.

Ces traitements enzymatiques suivis d'une séparation sur gel et hybridation spécifique sont utilisés comme diagnostic de reconnaissance des différentes formes de RTK.

Des **défauts de maturation** empêchant la localisation correcte des protéines membranaires ont déjà été impliqués dans des **pathologies** <sup>398</sup>.

C'est le cas par exemple de mutations dans l'ectodomaine de RET qui empêchent son repliement normal et entraînent sa rétention dans le ER ayant pour conséquence ultime une susceptibilité à la maladie de Hirschsprung (développement anormal du système nerveux entérique) <sup>399</sup>.

### 5-B-2-3- Maturation défectueuse des RTK activés

De nombreuses études ont montré une plus **faible expression de surface des RTK constitutivement activés** que leurs contreparties sauvages.

Dans le cas de KIT, voir par exemple une des études princeps de caractérisation des mutants murins 559 et 814 <sup>400</sup>.

D'abord ignorée, cette observation a ensuite été attribuée à une **dégradation plus rapide** des formes mutantes, que ce soit pour les mutants de KIT <sup>64</sup> ou d'autres récepteurs comme CSF1-R <sup>401</sup>.

Cependant, il a été récemment suggéré que cette baisse d'expression de surface puisse être attribuée à un **défaut précoce de maturation** lié au contrôle qualité effectué dans le ER.

Les premières analyses de ce phénomène proviennent de l'étude des mutants de **FGFR3** par l'équipe de Liboi <sup>402</sup>.

Ils montrent que contrairement au récepteur FGFR3 sauvage qui mature en 3 formes de poids moléculaires croissants distinctes, le mutant TDII reste majoritairement bloqué sous une forme intermédiaire immature riche en mannose (résidente du ER et du cis-Golgi). Ces expériences de pulse-chase à la méthionine S35 révèlent que la forme intermédiaire donne naissance à la forme mature et que celle-ci n'est pas un produit de dégradation secondaire de la forme mature. Les auteurs soulignent par ailleurs que la forme intermédiaire majoritaire des mutants est phosphorylée.

Ensuite, les équipes de Serve et Bohmer ont tenté d'expliquer les mécanismes moléculaires de cette rétention dans le cas de **FLT3-ITD** et de généraliser à d'autres récepteurs mutants<sup>200</sup>.

Comme FGFR3-TDII, FLT3-ITD est moins exprimé en surface que FLT3-WT à expression protéique totale équivalente, et une proportion importante de FLT3-ITD est retenue dans le ER sous forme immature. D'autre part, l'expression de surface de FLT3-ITD augmente après traitement avec un inhibiteur de tyrosine kinase. Le même résultat est obtenu avec le mutant FGFR3-TDII<sup>403</sup>.

Ainsi ce défaut de maturation serait lié à l'activité kinase constitutive des mutants.

Cette hypothèse est argumentée par la restauration de la présence en surface de FLT3-ITD après introduction d'une mutation supplémentaire qui annule son activité kinase (mutant FLT3-ITD-K644A kinase dead) ou suite à la sur-expression des phosphatases SHP-1 et PTP1B.

Cette étude apporte donc de nombreux arguments suggérant la relation de cause à effet entre l'activation des mutants et leur défaut de maturation.

Finalement, une observation identique a été faite sur **KIT**<sup>404</sup>.

Les mutations activatrices V560G et D816V introduites dans hKIT entraînent une disparition quasi-totale de l'expression de surface des récepteurs mutants qui se retrouvent majoritairement dans le RE sous forme glycosylées immatures mais phosphorylées. Et, comme pour FLT3-ITD, l'inhibition de l'activité kinase des récepteurs s'accompagne d'une augmentation de leur expression en surface.

L'augmentation de l'expression de surface des mutants après inhibition de l'activité kinase peut être interprétée de deux manières : une **augmentation de l'export des formes bloquées** ou une **stabilisation des formes membranaires**, qui, inactivées, cessent d'être dégradées. Les deux hypothèses envisagées pour expliquer le faible taux d'expression de surface des RTK activés sont donc une internalisation rapide ou un défaut de maturation, toutes deux reliées à l'activation constitutive des RTK. Ces deux mécanismes ne semblent pas exclusifs. Cependant certaines données suggèrent que l'endocytose et la dégradation ne seraient pas impliquées.

Comme mentionné précédemment, l'endocytose de KIT sauvage dépend de l'intégrité des RAFT et est perturbée par un traitement à la méthyl- $\beta$ -cyclodextrine <sup>227</sup>. Ce même traitement n'a aucun effet sur l'expression membranaire des formes activées du domaine JM suggérant que celle-ci ne puisse être expliquée par un taux plus élevé de dégradation <sup>405</sup>.

Enfin, il n'est pas impossible que l'expression membranaire de chaque RTK mutant dépende de manière différentielle de l'un ou l'autre des mécanismes voire des deux. Dans tous les cas, étant donné qu'un défaut de maturation a maintenant été décrit pour des GOF de PDGFR et FLT-3 <sup>200</sup>, FGFR3 <sup>403</sup>, et KIT <sup>404</sup>, il apparaît général que **l'activité kinase des mutants GOF de RTK entraîne un défaut de maturation dans le réseau d'adressage membranaire, ayant pour conséquence un défaut d'expression en surface.**

#### 5-B-2-4- Parenthèse sur le lien entre la phosphorylation et la maturation des RTK sauvages

Dans le cas des RTK activés, le **défaut de maturation serait lié à l'activité kinase constitutive des mutants**. Ce point de contrôle du réticulum conduisant à la rétention puis à la dégradation des RTK activés, pourrait s'appliquer aux RTK natifs, comme suggéré par Schmidt et al.

En effet, dans leur étude ils montrent que la sur-expression d'une SFK activée, capable de phosphoryler FLT3 WT entraîne un défaut de maturation du récepteur sauvage.

Ainsi, dans les conditions physiologiques, le maintien à l'état inactif des RTK serait une condition requise pour leur maturation efficace jusqu'à la surface <sup>200</sup>. Par ailleurs, il existe des phosphatases comme PTP1B qui sont ancrées dans la membrane du RE <sup>406</sup> et qui pourraient donc contrôler le statut de phosphorylation des polypeptides naissants.

Cette hypothèse est appuyée par le défaut de maturation de FLT3-WT obtenu après extinction par SiRNA de PTP1B <sup>200</sup>.

Enfin, FLT3-ITD interagit fortement avec les chaperones du RE <sup>200</sup>, laissant suggérer que le repliement anormal de la kinase puisse être reconnu par les chaperones qui assurent le contrôle qualité du RE et ainsi entraîner l'arrêt de maturation.

Nous n'avons pas trouvé d'autres données sur ce sujet pourtant prometteur.

## 5-B-2-5- Défaut de maturation des RTK activés: conséquences en terme de signalisation

Les formes oncogéniques des RTK sont peu présentes à la membrane. Nous pouvons donc envisager soit que cette faible quantité est suffisante pour induire la transformation, soit qu'une signalisation est possible à partir des compartiments intracellulaires. La signalisation à partir de compartiments intracellulaires ne serait pas une spécificité de la signalisation oncogénique (*confer* partie 3-D).

Deux questions se posent :

**Quelle est la contribution de cette signalisation intracellulaire des RTK oncogéniques dans la transformation cellulaire, mineure ou majeure?**

**Cette signalisation intracellulaire pourrait-elle rendre compte des différences de signalisation observées entre les formes sauvages et activées de certains oncogènes ?**

Différents éléments de réponses peuvent être apportés à ces questions.

### **a- À propos de la contribution oncogénique de la signalisation intracellulaire**

Il existe une lignée de glioblastome dans laquelle la transformation cellulaire est dépendante de l'activité d'une **protéine de fusion oncogénique FIG-ROS**. Or FIG est une protéine du Golgi et la fusion avec le RTK ROS résulte en une localisation golgienne de l'oncogène de fusion <sup>407</sup>. Dans ce cas il est clair que la localisation golgienne et la signalisation qui en découle sont capables de soutenir la transformation.

De récentes études laissent suggérer que les **formes intracellulaires de KIT** sont suffisantes pour induire la transformation cellulaire *in vitro* <sup>408</sup> et *in vivo* dans des pathologies comme les GIST <sup>405</sup>.

D'un point de vue moléculaire, à l'aide de constructions permettant de localiser le domaine kinase de KIT<sup>D816V</sup> dans différents compartiments (membrane, golgi, cytoplasme), il a été montré que toutes sont capables d'induire la prolifération indépendante de cytokines des cellules Ba/F3, la construction bloquée dans le Golgi étant aussi efficace que la forme KIT<sup>D816V</sup> normale. Par ailleurs, la forme intracellulaire (ICD-KitD816V), est capable d'induire une MPD fatale chez l'animal, suggérant que les formes membranaires ne sont pas nécessaires<sup>408</sup>.

De même une forme de **FLT3-ITD** restreinte dans le RE est capable *in vitro* de transformer des cellules 32D et *in vivo* d'induire une pathologie myéloproliférative fatale<sup>409</sup>.

Ainsi, les formes intracellulaires des RTK oncogéniques seraient suffisantes pour soutenir la transformation cellulaire.

### **b- À propos des différences entre les signalisations normales et oncogéniques**

Les travaux de notre laboratoire et d'autres ont contribué à mettre en évidence des **spécificités de la signalisation oncogénique de KIT<sup>D816V</sup>**. Ainsi la kinase FES est un effecteur majeur de la prolifération sous KIT<sup>D816V</sup> alors qu'elle n'intervient pas dans la prolifération médiée par KIT WT<sup>410</sup>. Inversement, les SFK qui ont un rôle fondamental sous KIT WT n'ont aucun rôle sous KIT<sup>D816V</sup><sup>411</sup>. L'équipe a aussi montré que les mutations de KIT de type régulatrices et enzymatiques diffèrent par leur activation et leur dépendance vis-à-vis de la voie PI3K/AKT.

De même la **signalisation oncogénique de FLT3-ITD** diffère de celle de FLT3 et conduit à l'expression d'un profil génique différent<sup>412</sup>.

La localisation différentielle des formes sauvages et mutées dans la cellule pourrait constituer une explication simple à ces observations, qui pourrait être liée (au moins en partie) au recrutement différentiel de partenaires. Quelques études ont tenté de répondre à cette question en utilisant des **drogues** ou des **séquences de rétention**.

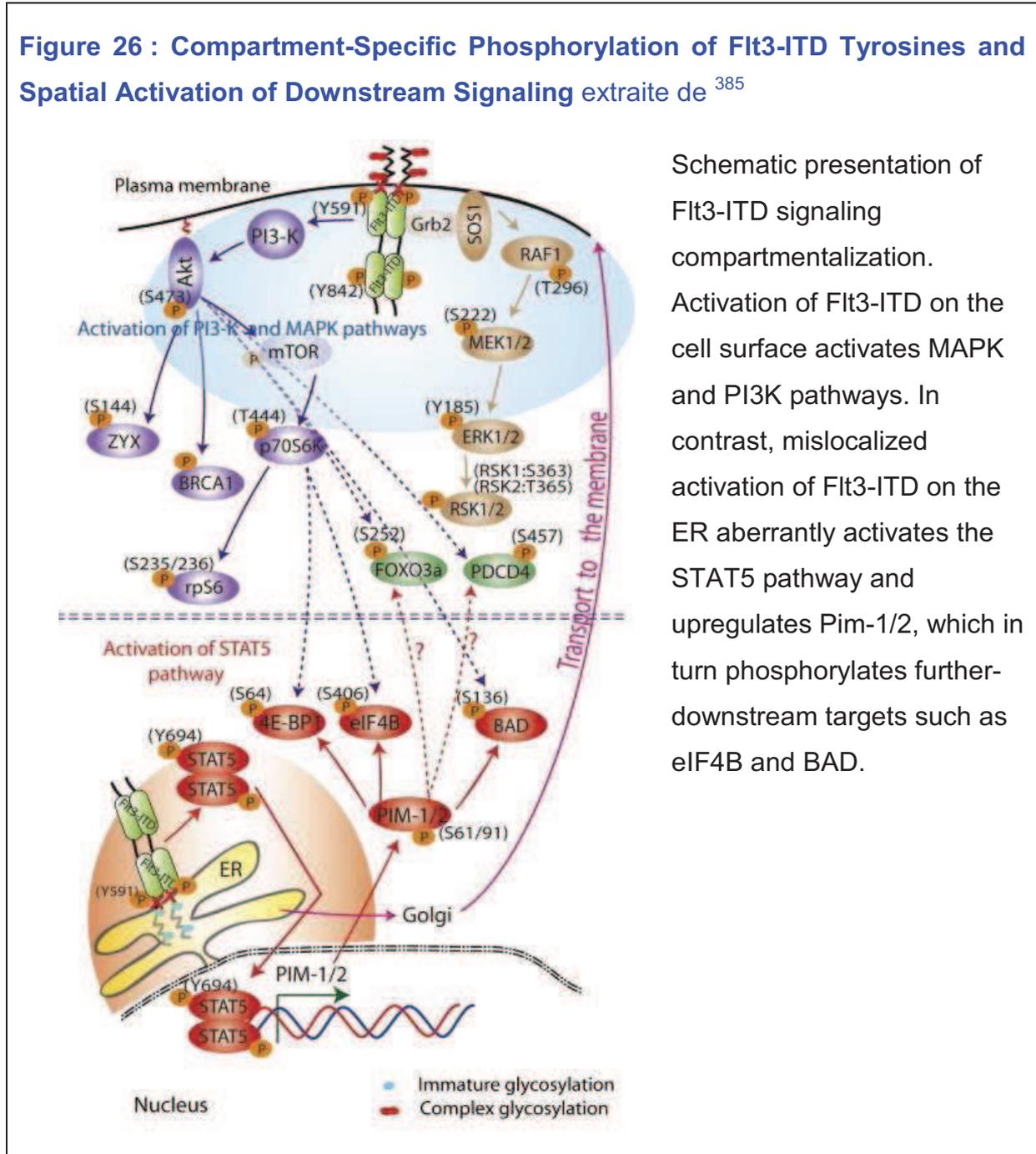
La **Brefeldine A** est une drogue d'origine fongique qui entraîne la fusion du Golgi et du ER<sup>413</sup>. Un traitement à la BFA a pour conséquence une perturbation du

trafic et empêche (entre autre) l'adressage des protéines membranaires vers la surface. L'équipe de Liboi a montré qu'après un traitement à la BFA, les **mutants FGFR3-TDII** étaient toujours capables d'activer STAT1, STAT3 et STAT5 suggérant que cette activation puisse se faire à partir du ER/Golgi <sup>403</sup>. FGFR3-TDII est capable d'activer la voie ERK en intracellulaire, mais ce de manière non conventionnelle par rapport à la forme sauvage <sup>414</sup>.

L'équipe de Bohmer a analysé les différences de signalisation entre **FLT3-ITD** et **une forme séquestrée dans le ER par l'ajout d'une séquence de rétention (FLT3-ITD-R3)**. Les résultats montrent que les deux formes activent STAT1, STAT3 et STAT5 de la même manière, suggérant là encore que cette activation ne nécessite pas une localisation membranaire <sup>409</sup>. A l'inverse, la phosphorylation de AKT et de ERK1/2 est diminuée dans le mutant R3.

Enfin, cette question a été adressée en **phosphoprotéomique quantitative** par l'équipe de Serve. Les auteurs comparent le profil global des phosphoprotéines activées par les formes membranaires et bloquées dans le ER de FLT3-ITD. Cette étude montre une compartimentalisation claire de la signalisation dont les conclusions sont schématisées sur la [figure 26](#) extraite de l'article <sup>385</sup>. Les formes bloquées dans le ER activent préférentiellement la voie STAT5-PIM ; les voies MAPK et AKT quant à elles sont activées par les formes membranaires.

**Figure 26 : Compartment-Specific Phosphorylation of Flt3-ITD Tyrosines and Spatial Activation of Downstream Signaling** extraite de <sup>385</sup>



Schematic presentation of Flt3-ITD signaling compartmentalization. Activation of Flt3-ITD on the cell surface activates MAPK and PI3K pathways. In contrast, mislocalized activation of Flt3-ITD on the ER aberrantly activates the STAT5 pathway and upregulates Pim-1/2, which in turn phosphorylates further-downstream targets such as eIF4B and BAD.

**Ainsi la localisation sub-cellulaire des RTK a une influence sur la qualité des voies activées.**

Il est à noter que dans cette même étude il est décrit une différence qualitative de phosphorylation du récepteur FLT3-ITD. La localisation subcellulaire pourrait donc influencer le codage spatial de la signalisation mais aussi la nature qualitative de la signalisation en affectant le niveau d'activation du récepteur.

## **5-C- Conclusion générale**

La signalisation oncogénique des RTK activés diffère de la signalisation physiologique au niveau de tous les paramètres **spatio-temporels** qui spécifient la signalisation intracellulaire.

Les modifications **quantitatives** (durée et amplitude, codage temporel) du signal oncogénique sont liées aux capacités d'échappement des oncogènes aux mécanismes de régulations négatives. Cet échappement caractéristique des RTK activés peut être direct ou indirect. Les mécanismes d'**échappement direct** concernent les mutations affectant les mécanismes d'autocontrôle de la kinase, et les mutations affectant le recrutement des effecteurs de la régulation négative (phosphatase et machinerie d'endocytose). L'**échappement peut aussi être indirect**, c'est-à-dire qu'il est la conséquence secondaire d'un autre phénomène. C'est le cas par exemple de l'échappement lié à une **modification de la localisation** des formes oncogéniques par rapport à leur contrepartie normale. Ainsi les mécanismes de régulations physiologiques qui prennent normalement naissance à la membrane sont dépassés par les localisations cytoplasmiques des oncogènes de fusion et dans des compartiments intracellulaires non conventionnels pour certains mutants ponctuels.

La signalisation oncogénique est caractérisée par une augmentation de l'amplitude et/ou de la demi-vie des RTK oncogéniques et de certaines voies de signalisation activées en aval. Si les modifications ne sont que quantitatives, on a des formes activées qui « ressemblent » aux récepteurs sauvages.

Cependant, dans de nombreux cas, la signalisation oncogénique s'accompagne aussi de **modifications qualitatives** de la signalisation. Ces variations peuvent là encore être **directes ou indirectes**. Des mutations, entraînant des modifications conformationnelles du RTK en affectant la boucle de reconnaissance des substrats, peuvent modifier la **spécificité catalytique** des enzymes. Des translocations peuvent conduire au recrutement de **nouveaux partenaires de signalisation** à proximité d'une kinase active. Enfin de manière indirecte, la **localisation sub-cellulaire** peut là encore affecter la spécificité de la

signalisation en favorisant l'activation de voies non conventionnelles via le recrutement de partenaires inhabituels ou en influençant la nature qualitative de la phosphorylation des récepteurs. On a alors une **altération du codage spatial** de la signalisation intracellulaire.

Tous ces **mécanismes ne sont pas exclusifs** et vraisemblablement **s'ajoutent** pour rendre compte et expliquer les différences entre signalisation oncogénique et physiologique. Les oncogènes viraux initialement décrits illustrent bien ce concept.

Par exemple v-kit cumule la perte du domaine extracellulaire et la perte du domaine JM auto-inhibiteur conférant à la kinase une indépendance totale vis-à-vis des mécanismes d'autocontrôles de l'activité kinase dépendants du ligand et du domaine JM. De plus c'est une kinase cytoplasmique active, susceptible de rencontrer tous les substrats possibles, et échappant à la régulation membranaire physiologique de son homologue sauvage. Enfin v-kit ne possède ni la tyrosine 568, ni la tyrosine 936 impliquées dans la régulation négative par les phosphatases et les ligases Cbl.

Par ailleurs, la liste des mécanismes que nous avons décrits n'est pas exhaustive et d'autres mécanismes viendront certainement s'y ajouter dans le futur.

Enfin s'il n'est pas exclu que certains mutants utilisent plusieurs mécanismes à la fois, il se pourrait que chaque oncogène utilise une combinaison unique de ces mécanismes.

A notre connaissance, il n'existe pas de description définitive de voies de signalisation intracellulaires activées uniquement par les RTK oncogéniques. Dans le cas de KIT par exemple, la voie PI3K/AKT est utilisée à la fois par le récepteur sauvage et les mutants mD814/hD816<sup>415 416</sup>. La voie des kinases FES, que l'équipe a d'abord décrite sous le récepteur mutant KIT<sup>D816</sup>, est aussi utilisée par le récepteur sauvage<sup>417</sup>. De la même manière, il est supposé que l'activation de STAT5 est spécifique à FLT3-ITD mais les données concernant l'activation de STAT5 par FLT3-WT sont contradictoires, avec des pours<sup>418</sup> et des contres<sup>419</sup>. L'activation d'autres protéines STATs par FLT3-ITD est elle aussi controversée<sup>409 420</sup>. Nous pensons que la spécificité de la signalisation oncogénique ne provient pas de l'utilisation de voies de signalisation intracellulaires *de novo* mais plutôt d'une activation inadaptée de ces

voies dans l'histoire de la cellule (c'est-à-dire en fonction de son stade de différenciation) et dans son contexte environnemental (c'est-à-dire en fonction des données du milieu extérieur). La présence d'un RTK oncogénique, via plusieurs effets moléculaires concomitants, favorise une réponse unilatérale de la cellule de type « prolifération en toutes circonstances », quelque soit son stade de développement (notion de cellules souches cancéreuses) et quelque soit l'intégration des autres données de l'environnement cellulaire, conduisant ainsi à une prolifération anarchique et à la formation de tumeurs.

Ce comportement anarchique de la cellule transformée est en grande partie dicté par le RTK oncogénique lui-même. Ceci est démontré par la remarquable efficacité anti-tumorale des inhibiteurs de tyrosine kinases (TKI) et est en accord avec la théorie de Weinstein sur l'addiction oncogénique <sup>421</sup>



## Travaux expérimentaux

Etude moléculaire et fonctionnelle de la  
signalisation oncogénique de KIT<sup>D816V</sup>.

Travaux expérimentaux : Etude moléculaire et fonctionnelle de la signalisation oncogénique de KIT<sup>D816V</sup>.

## **Partie 1 : Mécanismes de l'activation des STATs par KIT<sup>D816V</sup> et implication dans la transformation mastocytaire.**

Notre laboratoire et d'autres ont depuis longtemps observé l'activation constitutive de STAT1, STAT3 et STAT5 sous le mutant KIT<sup>D816V</sup>. L'objectif de ce travail était de déterminer les mécanismes moléculaires de leur activation ainsi que leur implication dans la transformation cellulaire dépendante de l'oncogène KIT<sup>D816V</sup>.

Nous avons choisi d'étudier la question dans le modèle des leucémies à mastocytes qui expriment de manière endogène les formes activées de KIT. Les lignées disponibles et utilisées dans cette étude sont la lignée humaine HMC-1.2, une lignée humaine exprimant hKIT<sup>D816V</sup> qui est la seule lignée de mastocytes humains qui peut être propagée en culture, et la lignée murine P815 qui exprime le mutant homologue mKIT<sup>D814Y</sup>.

L'intérêt de cette étude réside dans l'analyse simultanée des quatre protéines STATs dans deux modèles en parallèle avec la possibilité de dégager des mécanismes généraux ou spécifiques et de répondre à la question du rôle fonctionnel des différents STATs dans un modèle homogène.

La présentation de ce travail est précédée d'une introduction sur les protéines STATs.

## 1-A- Introduction

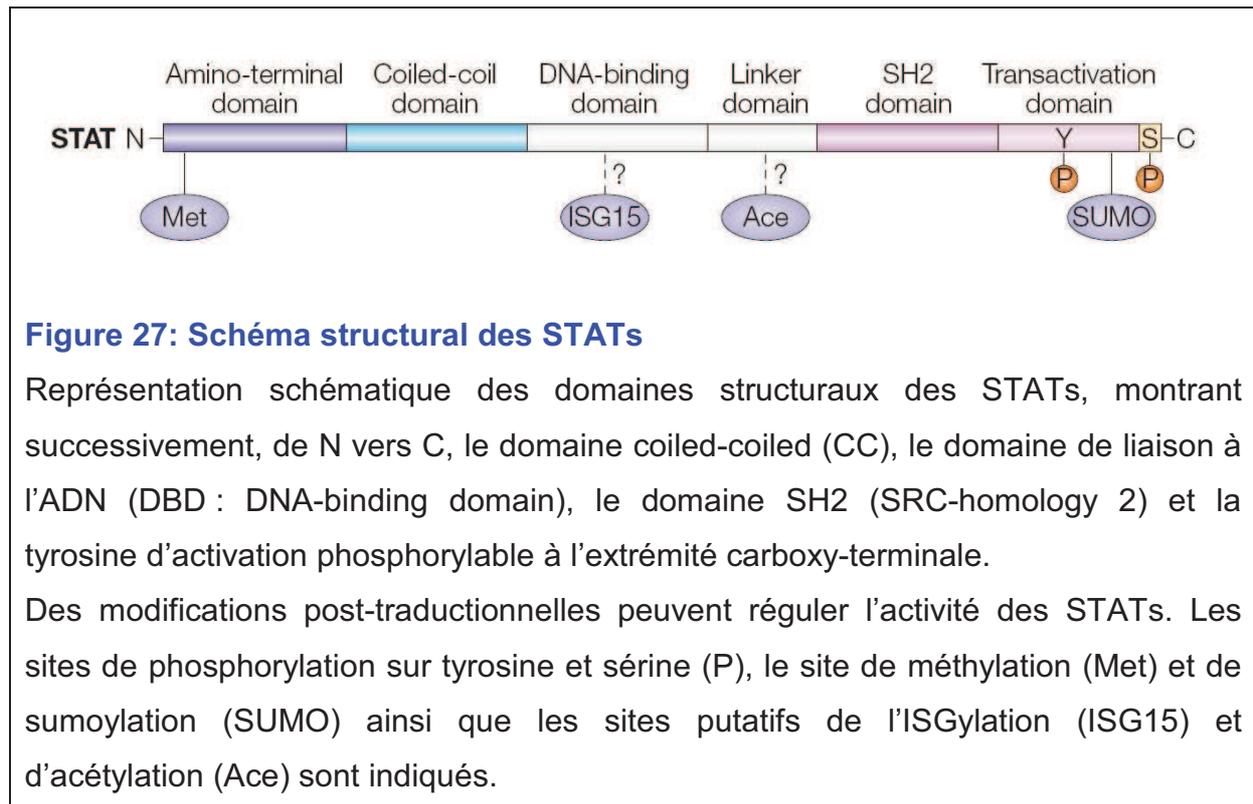
### 1-A-1- Physiologie des protéines STATs (Signal Transducers and Activators of Transcription)

#### 1-A-1-1- Gènes et protéines

Chez les mammifères, la famille STAT comporte sept membres. Chez l'homme, les gènes codants STAT1 et STAT4 sont localisés sur le chromosome 2, STAT2 et STAT6 sur le chromosome 12 et STAT3, STAT5A, et STAT5B sur le chromosome 17. Au cours de l'évolution, il semble que le gène *Stat* primordial se soit dupliqué donnant naissance à 2 gènes. Cet événement est suivi de deux duplications, vraisemblablement à l'échelle du génome entier, conduisant à la dispersion des 3 paires de gènes sur des chromosomes différents. La duplication en tandem donnant naissance à STAT5A et STAT5B est beaucoup plus récente {Copeland, 1995 #487}.

Chez *Drosophila melanogaster*, il existe un unique couple JAK/STAT codé par les gènes hopscotch et marelle (hop/mrl) codant les protéines JAK et Stat92E, homologues de JAK2/STAT5.

Les protéines STATs présentent toutes le même arrangement structural de différents motifs qui sont de N vers C: (i) un domaine N-terminal, (ii) un domaine d'interaction protéique de type coiled-coil (CC), (iii) le domaine de liaison à l'ADN (DBD: DNA Binding Domain), (iv) un domaine de liaison (linker), (v) un domaine SH2, (vi) un domaine de transactivation (TAD: Transactivation Domain) qui contient la tyrosine phosphorylable.



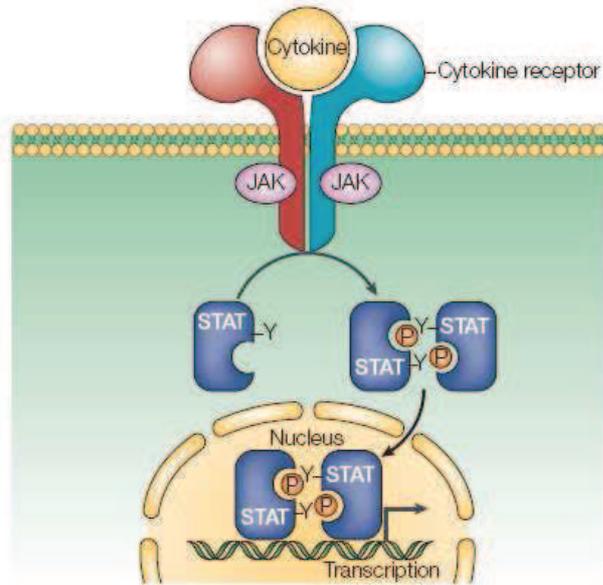
### 1-A-1-2- La voie JAK/STAT : le paradigme initial

En 1992, les protéines du complexe ISGF-3 (dont la protéine STAT91) sont décrites comme des facteurs de transcription phosphorylés suite à l'engagement de la voie de signalisation de l'IFN $\gamma$ <sup>422</sup>. Deux ans après, Darnell formule le paradigme de l'activation des STAT par les JAK<sup>423</sup>.

Dans ce modèle, les STATs sont des facteurs de transcription présents sous forme monomérique inactive dans le cytoplasme. L'activation des JAK suite à l'engagement d'un récepteur aux cytokines conduit à leur phosphorylation sur tyrosine. Cette phosphorylation induit la dimérisation des STATs et leur translocation successive dans le noyau. Ils activent alors la transcription de gènes cibles responsables des effets biologiques.

**Figure 28 : Schéma de la voie JAK/STAT canonique**

La stimulation des récepteurs aux cytokines induit l'activation des kinases de la famille JAK. Suite à leur phosphorylation sur tyrosine par les JAKs, les STATs se dimérisent par interaction réciproque de leur domaine SH2 et de la phosphotyrosine et sont transloqués dans le noyau où ils activent la transcription de gènes cibles.



Quinze années de recherche plus tard, de nombreuses données viennent enrichir et modifier le paradigme initial. En particulier, il apparaît aujourd'hui que :

- (i) d'autres tyrosine kinases que les JAK sont impliquées dans la phosphorylation des STATs,
- (ii) les STATs ne sont pas uniquement présents sous forme monomérique inactive dans le cytoplasme,
- (iii) l'import nucléaire ne nécessite pas forcément la phosphorylation sur tyrosine,
- (iv) d'autres modifications post-traductionnelles influencent l'activité transcriptionnelle des STATs,
- (v) les STATs peuvent avoir des fonctions non conventionnelles et/ou non transcriptionnelles.

1-A-1-3- Vers un nouveau modèle ?

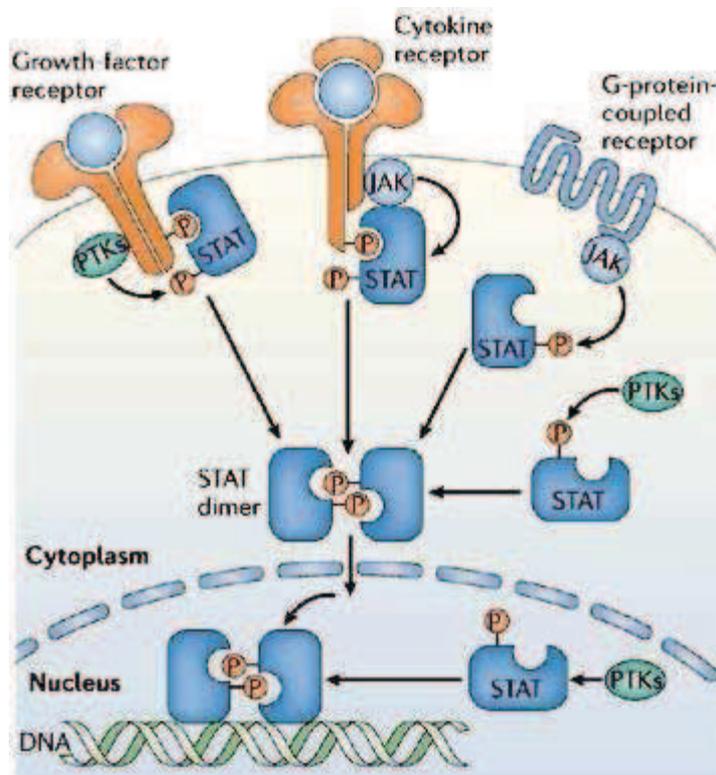
**a- À propos des voies conduisant à l'activation des STATs**

L'activation canonique des STATs par les JAK concerne les récepteurs aux cytokines tels que les récepteurs aux interférons ou aux interleukines<sup>422</sup>. Mais elle peut aussi provenir de l'activation d'autres récepteurs tels que les RCPG. Ceux-ci

peuvent activer la voie JAK/STAT suite à une stimulation hormonale, comme par exemple l'angiotensine II <sup>424</sup>, ou en réponse à des chemokines, comme par exemple CXCL12 <sup>425</sup>. Enfin, les STATs peuvent être activés par des RTK. La phosphorylation des STATs suite à l'activation des RTK requiert parfois l'activité des JAK mais elle peut aussi être indépendante des JAK. Dans ce cas elle peut faire intervenir les SFK comme c'est le cas suite à l'engagement d'EGFR <sup>426</sup> ou bien directement l'activité kinase des RTK eux-mêmes comme décrit pour les récepteurs IR <sup>427</sup> et PDGFR <sup>428</sup>.

**Figure 29 : Schéma des différentes voies conduisant à l'activation des STATs**

Les protéines STATs peuvent être activées suite à la phosphorylation par les kinases JAK associées à des récepteurs aux cytokines ou des récepteurs à sept passages transmembranaires couplés aux protéines G mais aussi par d'autres tyrosine kinases libres dans le cytoplasme ou le noyau ou associées à des RTK. La phosphorylation permet la dimérisation des STATs, leur translocation dans le noyau et l'activation des gènes cibles.



### b- A propos des monomères de STATs

Une étude structurale récente suggère que STAT1 serait majoritairement présent dans le cytoplasme sous forme dimérique <sup>429</sup>. En fait il existe deux conformations possibles de dimères et la phosphorylation sur tyrosine déplace l'équilibre en faveur de la conformation « en parallèle » des dimères, une conformation plus active en transcription <sup>430</sup>. Par ailleurs il semble que plus que

mono ou dimériques, les STATs soient en fait capables de se multimériser<sup>431</sup> et de former des macro-complexes appelés « Statosome »<sup>432</sup>.

### **c- A propos du transport nucléo-cytoplasmique des STATs**

Pour une revue sur le sujet, consulter par exemple la référence<sup>433</sup> et l'ensemble des travaux de Nancy C Reich and Kevin M McBride.

Les mécanismes du trafic nucléo-cytoplasmique de STAT1 et STAT3 sont bien élucidés et s'avèrent différents pour l'un et l'autre.

Dans le cas de STAT1, les séquences d'import (NLS) et d'export (NES) nucléaires sont superposées. Lorsque STAT1 est phosphorylé, la NES est masquée, favorisant l'accumulation de STAT1 dans le noyau, tandis que c'est la NLS qui est masquée dans la forme non phosphorylée. L'import nucléaire de STAT1 est dépendant des protéines de transport importine  $\alpha 5$  et son export de l'exportine 1.

Dans le cas de STAT3, les séquences NLS et NES sont visibles quelque soit l'état de phosphorylation du facteur et il existe un **transit permanent** des formes phosphorylées et non phosphorylées entre le noyau et le cytoplasme. L'équilibre est en faveur de l'import.

Dans le cas de STAT5, un mécanisme intermédiaire entre les deux précédemment décrits paraît s'appliquer.

Par ailleurs, il semble que les importines impliquées dans le transit soient différentes pour chacun des STAT.

### **d- A propos des modifications post-traductionnelles des STATs**

Les STATs sont soumis à d'autres modifications post-traductionnelles que la phosphorylation sur leur tyrosine activatrice telles que l'acétylation, la méthylation, l'ISGylation<sup>434</sup>, l'ubiquitination, la sumoylation<sup>435</sup> et d'autres phosphorylations (revue dans<sup>436</sup>.

En particulier, une phosphorylation sur sérine dans le domaine de transactivation N-terminal est requise pour l'activité transcriptionnelle maximale de STAT1, STAT3, STAT4 et STAT5A/B *in vitro*<sup>437, 438, 439</sup>.

L'étude des souris knocked-in STAT3-S727A<sup>440</sup> et STAT1-S727A<sup>441</sup> a révélé le rôle fondamental de cette phosphorylation *in vivo*.

Les souris *Stat3-SA/Stat3-* présentent une mortalité néonatale et les survivantes ont un défaut de croissance majeur. Dans les fibroblastes embryonnaires issus des souris SA/SA, l'activité transcriptionnelle de STAT3 est réduite de 50%.

Les souris *Stat1-S724A* présentent un défaut de la réponse immunitaire innée liée à la voie de l'IFN $\gamma$ .

La sérine du TAD est située dans un motif riche en proline. La séquence PMSF est parfaitement conservée dans STAT1, 3 et 4 et on trouve une séquence équivalente PSP dans STAT5 A et B. Ces séquences de type P(M)SP sont des séquences proches du site consensus de phosphorylation par les MAPK. Celles-ci semblent en effet souvent impliquées dans cette phosphorylation.

Le rôle de cette phosphorylation n'est pas clairement élucidé sauf dans le cas de STAT1. Pour ce dernier, il apparaît que la phosphorylation n'est ni requise pour la liaison à l'ADN, ni pour la localisation nucléaire. L'hypothèse la plus vraisemblable semble être le recrutement de partenaires protéiques permettant d'activer la machinerie de transcription. Dans le cas de STAT1, la liaison de STAT1 à l'ADN est requis pour sa phosphorylation sur sérine <sup>442</sup>.

Les MAPK sont les meilleures candidates pour réaliser cette phosphorylation et ont souvent été impliquées. En particulier il semble que lorsque ERK2 est active, elle est la kinase qui phosphoryle STAT3. D'autres voies ont par ailleurs été décrites (voies des MAPK JNK et p38, PKC delta, mTOR...).

Collectivement, les données de la littérature suggèrent que :

- (i) La phosphorylation sur sérine d'un STAT peut faire intervenir des kinases différentes dans des modèles différents
- (ii) Dans une même cellule, la phosphorylation sur sérine de différents STATs peut faire intervenir des voies de signalisation différentes.

*Pour une revue sur la phosphorylation sur serine des STATs, consulter la référence*

## e- À propos des fonctions non conventionnelles et non transcriptionnelles des STATs

Développé au paragraphe 1-A-1-5-b.

### 1-A-1-4- Les régulations négatives du signal STAT

La durée de vie de l'activation nucléaire des STATs est de l'ordre de 15 minutes.

La régulation négative du signal STAT fait intervenir trois grands mécanismes de rétrocontrôle négatifs :

(i) la déphosphorylation par les PTPs

(ii) les protéines SOCS (suppressors of cytokine signalling)

Les SOCS agissent au niveau proximal sur le complexe d'initiation du signal. Comme décrit précédemment, elles peuvent agir de trois manières distinctes : par l'inhibition des JAK, par compétition pour les sites de recrutement et enfin par l'induction de la dégradation par le protéasome des protéines ciblées.

(iii) les protéines PIAS (proteins that inhibit activated STATs)

Les PIAS agissent au niveau terminal sur les STATs dans le noyau. Elles agissent aussi par différents mécanismes dont l'inhibition de la liaison à l'ADN, le recrutement de co-répresseurs et via la sumoylation des STATs dont le rôle n'est pas encore clairement établi.

*Pour des revues sur les régulations négatives de la voie JAK/STAT, consulter les références <sup>182, 444</sup>.*

*Pour des revues sur les SOCS, consulter les références <sup>445, 210</sup>.*

### 1-A-1-5- Les fonctions biologiques des STATs

Les effets biologiques des STATs ont été étudiés *in vitro* et *in vivo*. Le [tableau3](#) suivant récapitule les principales fonctions des STAT1, STAT3 et STAT5 à l'échelle de l'organisme (données issues de l'analyse des souris transgéniques), à l'échelle cellulaires ainsi que les perturbations oncogéniques associées.

**Tableau 3: Fonctions biologiques et oncogéniques de STAT1, STAT3 et STAT5.**

	<b>Phénotype des souris STAT déficientes</b>	<b>Fonctions Cellulaires</b>	<b>Corrélation avec les Cancers</b>
<b>STAT3</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ KO embryonnaire létal <sup>446</sup></li> <li>▪ Expression Ubiquitaire</li> <li>▪ Délétions tissus spécifiques: actions pléiotropiques, défauts multiples</li> </ul> Cellules épithéliales, Kératinocytes, Glande mammaire, Lymphocytes...	<p style="text-align: center;"><b>Promotion de la prolifération</b></p> <p style="text-align: center;"><b>Inhibition de l'apoptose</b></p>	Activation constitutive de STAT3 et STAT5 participent au développement et à la progression tumorale
<b>STAT5 A/B</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ KO double : Souris viables mais problème de fertilité <sup>447</sup></li> <li>▪ Défauts dans la glande mammaire</li> <li>▪ Défauts dans le compartiment hématopoïétique <sup>448</sup></li> <li>▪ Pas de mastocytes <sup>449</sup></li> </ul>		Modèles cellulaires, Cultures primaires, Modèles animaux, Echantillons de tumeurs avec tissus normaux adjacents
<b>STAT1</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ KO: Souris viables, phénotype normal <sup>450</sup></li> <li>▪ Défaut des fonctions associées à la voie de l'IFN<math>\gamma</math> (réponse immunitaire innée défectueuse)</li> <li>▪ Développement spontané de tumeurs</li> </ul>	<p style="text-align: center;"><b>Induction de la mort cellulaire</b></p>	Inhibition de la prolifération  Potentiel Gène Suppresseur de Tumeur <sup>451</sup>

*Pour une revue présentant le phénotype des souris déficientes pour les STATs et toutes les références associées, consulter la référence <sup>452</sup>.*

Les fonctions biologiques des STATs s'exercent majoritairement via leur effet transcriptionnel mais pas uniquement.

#### **a- Les cibles et fonctions transcriptionnelles des STATs**

Les cibles transcriptionnelles des STATs sont nombreuses. Une étude à l'échelle du génome (Genome-wide ChIP-chip) dans des cellules ES a révélé plus de 700 gènes cibles de STAT3, à peine à moitié moins que le facteur de transcription c-myc avec seulement 200 gènes se recouvrant <sup>453</sup>.

## **b- Les fonctions non conventionnelles et non transcriptionnelles des STATs**

Des exemples d'activités non conventionnelles des STATs sont essentiellement documentées dans le cas de STAT3. Nous présentons ici quelques uns de ces exemples.

### **(i) Stat3, une protéine mitochondriale**

Une étude récente suggère que STAT3 est un **modulateur de la respiration mitochondriale**.

Son rôle dans l'activation de la chaîne respiratoire dépend de sa localisation dans la mitochondrie, de sa phosphorylation sur la sérine du domaine TAD et est indépendant de son activité transcriptionnelle <sup>454</sup>.

Par ailleurs dans la transformation dépendante de H-RasV12, la présence nécessaire de STAT3 est aussi indépendante de son activité transcriptionnelle et passerait par sa fonction mitochondriale <sup>455</sup>. Cette donnée est d'intérêt majeur dans le cadre de nos travaux.

*Pour un commentaire de Nancy C Reich sur ces deux articles, consulter la référence <sup>456</sup>.*

### **(ii) Stat3, un adaptateur**

Plusieurs études suggèrent le rôle de STAT3 comme adaptateur fondamental dans la **motilité cellulaire**.

Des kératinocytes *Stat3* <sup>-/-</sup> ont un défaut majeur de migration lié à l'absence de phosphorylation de p130CAS, une protéines des points focaux d'adhésion phosphorylée par FAK <sup>457</sup>.

STAT3 se localise aux points focaux d'adhésion où il interagît avec plusieurs protéines appartenant à ces structures, telles que la kinase FAK ou la paxiline <sup>458</sup>.

Enfin STAT3 serait impliqué dans la stabilisation de la polymérisation des microtubules via son interaction avec la stathmine <sup>459, 460</sup>.

*Pour une revue sur les rôles de STAT3 dans la migration, consulter la référence <sup>461</sup>.*

### **(iii) Stat3, un co-activateur transcriptionnel**

STAT3 peut agir comme modulateur transcriptionnel d'autres facteurs de transcription.

Par exemple, en réponse à une stimulation à l'IL6, STAT3 non phosphorylé s'accumule dans le noyau et agirait comme co-activateur transcriptionnel de la voie NFκB<sup>462</sup>.

*Pour une revue sur le rôle des STATs non phosphorylés en tant que modulateurs transcriptionnels, consulter la référence<sup>463</sup>.*

## **1-A-2- STATs et cancers**

L'hypothèse initiale de l'implication de la voie JAK/STAT dans les leucémies humaines provient d'études chez la drosophile<sup>464, 465</sup>.

En 1981 est décrit le mutant de drosophile *Tumorous-lethal (Tum-I)* qui meurt d'une hyperprolifération dans le compartiment hématopoïétique mimant une leucémie. (leukemia-like blood cell proliferation). En 1993 on découvre que la mutation associée au phénotype *Tum-I* n'est autre qu'un gain de fonction de la kinase JAK<sup>466</sup>; le mutant est alors appelé *hop<sup>Tum-I</sup>*. En 1996, un criblage de génétique reverse conduit à l'isolement du mutant dominant suppresseur du phénotype qui présente une perte de fonction de STAT92E.

Dans les années 95, plusieurs études décrivent l'activation constitutive de STAT3 par l'oncogène v-src<sup>467</sup> et en 1998 la première démonstration est faite que STAT3 est requis pour la transformation cellulaire dépendante de v-src<sup>468, 469</sup>.

Depuis, de nombreuses oncoprotéines ont été décrites pour activer les STATs de manière constitutive incluant des gains de fonctions de JAK2 (Jak2V617F, Tel-Jak2), de SFK mais aussi de RTK (FLT3-ITD, EGFR, Tel-PDGFR, KIT-D816V) (revue dans<sup>470</sup>)

L'activation constitutive des STATs est décrite dans les tumeurs solides en particulier celles exprimant EGFR. *Pour une revue sur le sujet, consulter la référence<sup>471</sup>.*

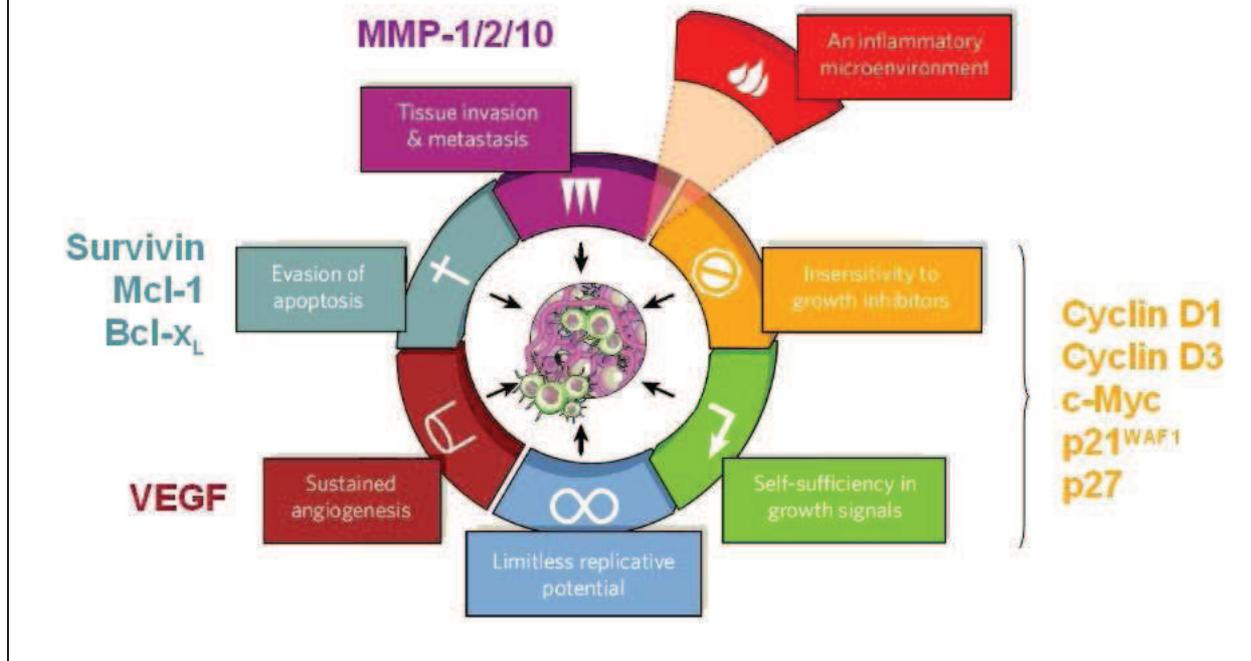
L'activation constitutive des STATs est aussi retrouvée dans la majorité des leucémies, quelles soient chroniques (CML, CMML, CLL) ou aiguës (AML, APL, ALL) (tableau 4). *Pour des revues sur le sujet, consulter les références<sup>472</sup> ou<sup>470</sup>.*

Tumour type	Activated STAT
<b>Blood tumours</b>	
Multiple myeloma	STAT1, STAT3
Leukaemias:	
HTLV-I-dependent	STAT3, STAT5
Erythroleukaemia	STAT1, STAT5
Acute myelogenous leukaemia (AML)	STAT1, STAT3, STAT5
Chronic myelogenous leukaemia (CML)	STAT5
Large granular lymphocyte leukaemia (LGL)	STAT3
<b>Lymphomas:</b>	
EBV-related/Burkitt's	STAT3
Mycosis fungoides	STAT3
Cutaneous T-cell lymphoma	STAT3
Non-Hodgkins lymphoma (NHL)	STAT3
Anaplastic large-cell lymphoma (ALCL)	STAT3
<b>Solid tumours</b>	
Breast cancer	STAT1, STAT3, STAT5
Head and neck cancer	STAT1, STAT3, STAT5
Melanoma	STAT3
Ovarian cancer	STAT3
Lung cancer	STAT3
Pancreatic cancer	STAT3
Prostate cancer	STAT3

**Tableau 4 : Activation des STATs dans les tumeurs solides et les leucémies (tableau issu de la référence <sup>473</sup>)**

Beaucoup d'études ont montré que l'inhibition des STATs conduisait à un arrêt de la prolifération tumorale et à l'apoptose des cellules cancéreuses. En ce qui concerne STAT3, un nombre de gènes restreint est couramment impliqué dans la transformation cellulaire. Ces gènes sont représenté positionné sur le schéma des « hallmarks of cancer » de Hanahan et Weinberg <sup>308</sup>.

Figure 30 : Cibles transcriptionnelles de STAT3 impliquées dans la transformation cellulaire



L'implication de **STAT1** dans la transformation cellulaire est plus **problématique**. En effet il a un rôle majeur dans l'induction de la mort cellulaire<sup>474</sup> et les animaux transgéniques suggèrent son action comme potentiel gène suppresseur de tumeur<sup>451</sup>. Dans certains cas, il peut aussi avoir une action oncogénique. C'est le cas dans les leucémies<sup>475</sup>. De manière très intéressante, cette étude montre que le rôle de STAT1 dans le développement leucémique pourrait être lié à une intervention non autonome cellulaire via une diminution de l'activité des mécanismes immunitaires de protection anti-tumorale. **La balance entre la contribution autonome cellulaire des oncogènes et les systèmes de protections antitumorales pourrait être un phénomène général** et pourrait permettre de réconcilier certaines données sur le double rôle oncogénique et suppresseurs de tumeur associé à certains gènes<sup>476</sup>.

*Pour une revue sur les rôles de STAT1 dans la mort cellulaire, consulter la référence 474.*

*Pour une revue sur le rôle des STATs dans l'inflammation et l'immunité cancéreuse, consulter la référence 477.*

## Les protéines STATs sont-elles des cibles thérapeutiques potentielles ?

De manière générale, les facteurs de transcription sont de bonnes cibles thérapeutiques car beaucoup de voies de signalisation semblent converger sur un petit nombre de facteurs de transcription nucléaires.

*Pour une revue sur la relevance thérapeutique du ciblage des facteurs de transcription, consulter la référence <sup>478</sup>.*

Quatre paramètres définissent une bonne cible thérapeutique pour le développement de thérapies ciblées, sur le plan médical et industriel. La cible (i) doit être impliquée dans plusieurs types de tumeurs (argument économique), (ii) elle doit être engagée dans au moins quatre propriétés acquises de la cellule cancéreuse telles que décrites par Weinberg, (iii) elle doit être « ciblable » (drug targetable) et enfin (iv) les cellules cancéreuses doivent y être dépendantes (oncogene addiction), alors que, de préférence, les cellules normales ne le sont pas.

*D'après la revue bibliographique "THE STATs OF CANCER — NEW MOLECULAR TARGETS COME OF AGE " <sup>473</sup>.*

**Les STATs se sont révélés être de bons candidats.** En effet, comme montré précédemment pour STAT3 ils affectent plusieurs propriétés des cellules cancéreuses (Figure 30) et beaucoup de celles-ci présentent une addiction à leur activation oncogénique (revue dans <sup>479</sup>). Ils sont impliqués dans de nombreuses pathologies cancéreuses (Tableau 4), et de nombreuses stratégies sont envisageables pour inhiber leur action. Quelques unes sont détaillées.

La première possibilité est l'inhibition des voies conduisant à l'activation des STATs.

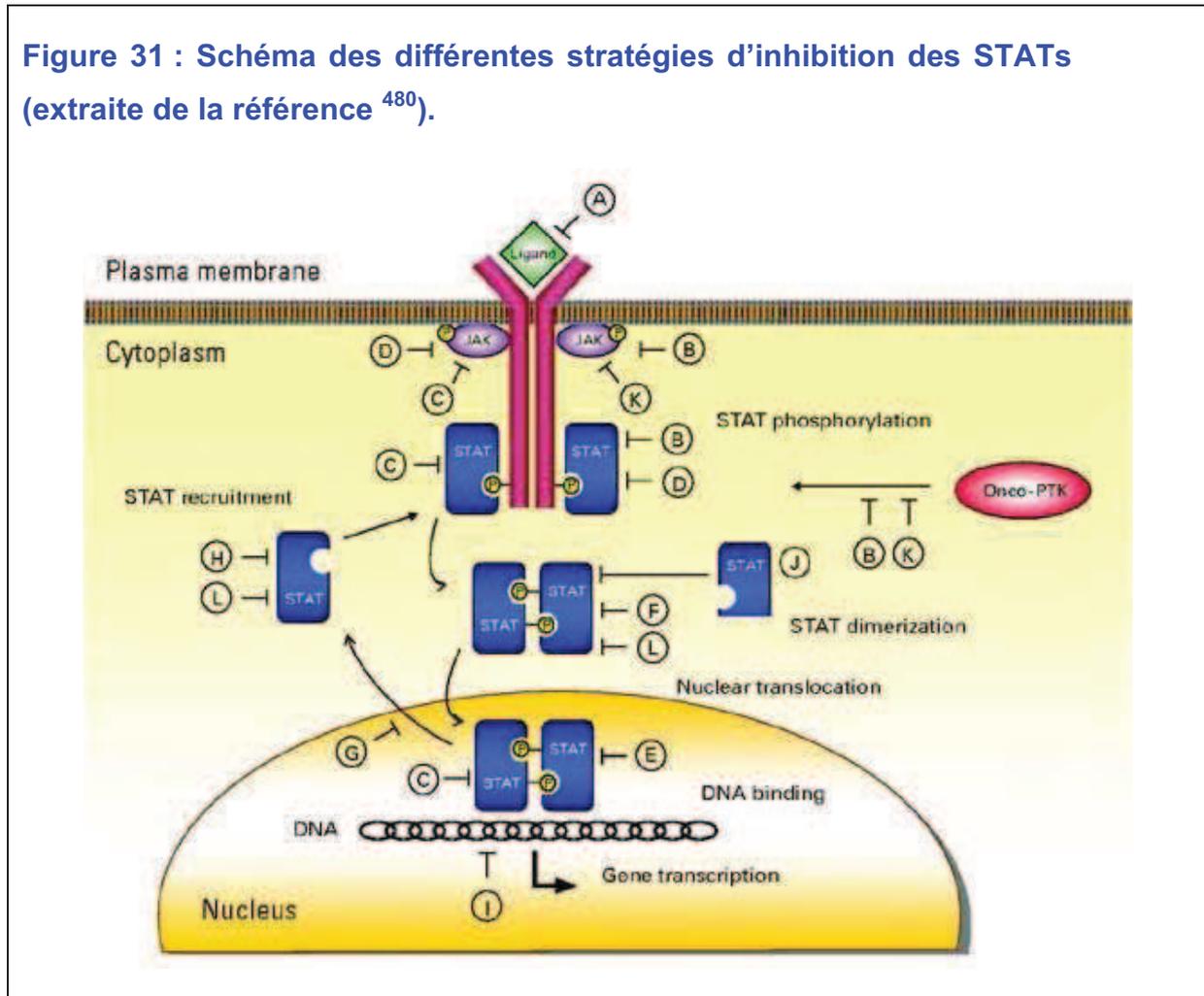
A : Les récepteurs peuvent être ciblés avec des ligands antagonistes ou des anticorps bloquants.

B et K: Les tyrosine kinases peuvent être ciblées à l'aide d'inhibiteurs spécifiques (ITK) ou de composés chimiques.

C : Les PTPs spécifiques des tyrosine kinases peuvent être activées.

Une autre stratégie possible est d'activer les régulateurs négatifs physiologiques de la voie JAK/STAT que sont les PTPs (C), les SOCS (D) et les PIAS (E).

Figure 31 : Schéma des différentes stratégies d'inhibition des STATs (extraite de la référence <sup>480</sup>).



Enfin, on peut interférer directement avec la fonction des STATs.

F : Des peptidomimétiques peuvent empêcher la dimérisation des STATs et ont déjà montré leur efficacité *in vitro* et *in vivo* <sup>481, 482</sup>,

G : Le transport nucléaire des STATs peut être bloqué.

H : L'expression protéique des STATs peut être diminuée en utilisant des oligonucléotides antisens ou des SiRNA.

I et L : Leur liaison avec l'ADN peut être inhibée avec des G-quartets et des composés chimiques.

J : L'action des STATs endogènes peut être perturbée par l'ajout des formes tronquées de STATs ayant un effet dominant négatif.

Certaines de ces stratégies ont déjà montré leur efficacité, d'autres sont à l'essai.

Pour une revue sur le sujet, consulter la référence <sup>480</sup> dont cette analyse est issue.

Comprendre les mécanismes par lesquels les STATs sont activés et comment ils interviennent dans la transformation cellulaire est donc d'une importance majeure pour la suite du développement des thérapeutiques ciblées.

## **1-B- Résultats expérimentaux**

### **1-B-1- Les mécanismes d'activation des STATs : Etude biochimique**

La première partie du travail concerne le décryptage des mécanismes d'activation de STAT1, STAT3 et STAT5 dépendants de l'oncogène KIT<sup>D816V</sup> dans un modèle homogène de leucémies à mastocytes.

**Objectif :** Connaître l'implication de différentes kinases dans la phosphorylation sur tyrosine et sérine des différents STATs.

**Démarche expérimentale:** Utilisation d'inhibiteurs spécifiques, de siRNA et de tests kinase *in vitro*.

Les résultats de cette étude biochimique des mécanismes d'activation font l'objet d'un article soumis au journal JBC intitulé « **Mechanisms of STAT proteins activation by oncogenic KIT mutants in neoplastic mast cells** ». L'article est joint et n'est pas repris en français.

### **1-B-2- Implication des STATs dans la transformation cellulaire : Etude fonctionnelle**

La deuxième partie du travail concerne l'analyse fonctionnelle du rôle des STATs activés dans la transformation cellulaire dépendante de KIT<sup>D816V</sup> dans un modèle homogène de leucémies à mastocytes.

**Objectif :** Connaître l'implication de chaque protéine STAT dans différentes fonctions liées à la transformation cellulaire dans un modèle homogène.

**Démarche expérimentale** : Utilisation d'une approche d'extinction protéique par ARN interférence, d'abord avec des siRNA puis avec des ShRNA et analyse des conséquences dans des tests de prolifération *in vitro* et *in vivo*.

Malheureusement, cette étude n'a pas permis de conclure sur la question. Quelques explications sont présentées dans la suite.

### 1-B-2-1- De l'utilisation des SiRNA

Nous avons utilisé des SiRNA dirigés contre les formes murines et humaines de STAT1, STAT3, STAT5A et STAT5B. Les cellules ont été transfectées par électroporation, la technique la plus efficace parmi les nombreuses testées dans le laboratoire. Après vérification de l'extinction protéique par western blot, les cellules sont comparées dans leur capacité proliférative par deux tests, (i) un test d'incorporation de thymidine tritiée qui permet de quantifier la synthèse d'ADN, et (ii) un test de luminescence (TiterGlow, Promega) quantifiant l'ATP qui est proportionnel au nombre de cellules viables.

Les résultats obtenus n'ont pas été concluants pour différentes raisons explicitées ci-dessous.

#### **a- À propos du taux d'extinction**

- (i) Le taux d'extinction protéique obtenu a été très variable d'une expérience à l'autre, sans doute fonction de l'efficacité de la transfection. Malgré une rigueur particulière apportée à l'entretien des lignées et à la standardisation des conditions d'électroporation et d'ensemencement, nous n'avons pas réussi à être reproductible.
- (ii) Indépendamment, l'extinction dans la lignée P815 a toujours été supérieure à 50% tandis que le taux maximal dans la lignée HMC-1.2 n'a jamais dépassé les 50%. Cette lignée s'est présentée généralement réfractaire à l'extinction par SiRNA pour plus de 20 SiRNA différents testés, une résistance totale étant d'ailleurs observée dans le cas du SiRNA dirigé contre KIT.

### **b- À propos de l'effet off-target des SiRNA**

Nous avons pu observer un effet drastique sur la prolifération des cellules P815 après extinction de STAT3 à l'aide d'un SiRNA. Cependant, lorsque nous avons voulu reproduire cette expérience avec un deuxième SiRNA indépendant, nous n'avons observé aucun effet sur la prolifération. Après vérification en western blot, les deux SiRNA conduisaient pourtant à une extinction quasi-totale de l'expression de la protéine STAT3.

Nous avons ainsi conclu à un **effet off-target du premier SiRNA** et introduit comme condition nécessaire dans nos travaux **l'obligation d'obtenir le même résultat par l'utilisation de deux SiRNA différents.**

Nous nous sommes donc procuré deux autres SiRNA dirigés contre STAT3 et ceux-ci n'ont eu aucun effet sur la prolifération des cellules P815.

Nos expériences nous laissent donc penser que **STAT3 ne serait pas impliqué dans la prolifération oncogénique sous KIT<sup>D816V</sup>.**

Les données de la littérature suggèrent le contraire. Une étude a montré que STAT3 était requis dans l'induction de la prolifération indépendante de cytokine de cellules Mo7e transformées par KIT<sup>D816V</sup> 483. Cette étude a été réalisée dans un contexte cellulaire différent du notre avec des cellules n'exprimant pas le récepteur activé de manière endogène. Par ailleurs la démonstration du rôle de STAT3 est issue de l'analyse de l'effet d'un dominant négatif de STAT3. Les différences de contexte cellulaire et de techniques pourraient expliquer les différences entre nos résultats. Il nous semblerait important de tester cette hypothèse en réalisant une expérience de SiRNA dans ces mêmes cellules.

### **c- À propos des tests de prolifération**

De manière reproductible, l'extinction de STAT5B par SiRNA a conduit à une diminution de la prolifération des cellules P815 et HMC-1. Cette diminution pouvait aller de 50% à 70% dans des tests réalisés en thymidine tritiée. La même analyse réalisée en luminescence, ne présentait qu'une diminution de 20% à 30%. L'écart type dans ce genre de test étant de 20%, nous avons considéré comme non significatives des modifications ne dépassant pas les 30%.

Ainsi, le résultat dépendait du test effectué. Malheureusement, l'autorisation du laboratoire de manipuler la radioactivité arrivant à échéance, nous avons été contraints d'utiliser des tests froids qui n'ont pas été concluants.

### 1-B-2-2- De l'utilisation des ShRNA

Pour palier à certains problèmes évoqués précédemment, nous avons changé de stratégie d'extinction et utilisé une approche par ShRNA en collaboration avec Isabelle Dusanter et Séverine Martin. Cette approche a été choisie pour les possibilités qu'elle offre d'obtenir une efficacité de transfection de 100% grâce à l'utilisation de vecteurs lentiviraux. Cependant ces expériences n'ont pas non plus permis de conclure pour différentes raisons.

Nous nous sommes procuré la lignée HMC-1.2 auprès du docteur Butterfield qui l'a initialement dérivée. Cette lignée s'est montrée totalement réfractaire à l'infection lentivirale alors que des résultats publiés suggèrent la possibilité de telles infections<sup>484</sup>. L'existence de plusieurs lignées HMC-1, les HMC-1.2 et les HMC-1.1 (que nous savons par ailleurs beaucoup moins difficiles à transfecter) sème la confusion !

L'infection de la lignée P815 a été un succès pour le ShRNA dirigé contre STAT5 avec des taux d'infection avoisinant parfois les 100%. Malgré cela, trois expériences ont donné des résultats de prolifération différents *in vitro*. Nous n'avons pas pu interpréter ces résultats.

### 1-C- Les questions en suspend... Perspectives de ce travail

Sur le plan fonctionnel, nous pensons que la question de la contribution de STAT1, STAT3 et STAT5 dans la transformation oncogénique dépendante de KIT<sup>D816V</sup> est toujours une question ouverte. Leur rôle dans la prolifération mais aussi dans d'autres fonctions liées à l'activité de KIT<sup>D816V</sup> telles que la migration et l'adhésion reste à déterminer. Le rôle de STAT5 est documenté dans la bibliographie

et il semble qu'il soit nécessaire à la prolifération. Cependant le rôle des autres STATs est moins clair et de plus leur action combinée n'a jamais été étudiée.

Les données récentes suggérant que STAT3 puisse avoir un rôle non transcriptionnel dans la transformation cellulaire dépendante de Ras-V12 sont d'une importance fondamentale pour nous <sup>454</sup>. Bien que nous ne puissions affirmer l'absence d'activité transcriptionnelle de STAT3 dans nos modèles par nos tests de plasmides rapporteurs, STAT3 pourrait contribuer à l'oncogenèse indépendamment de cette activité. Il serait très intéressant de tester l'activité de la chaîne respiratoire mitochondriale suite à l'extinction de STAT3.

Concernant les mécanismes de l'activation des STATs par KIT<sup>D816V</sup>, nous espérons avoir débroussaillé le terrain. Une des hypothèses que nous n'avons pas testée et qui nous semble pouvoir jouer un rôle majeur est liée la localisation subcellulaire de cette activation.

Quelques expériences préliminaires ont été réalisées dans ce sens. Par du fractionnement cellulaire, nous avons pu immunoprécipiter KIT spécifiquement dans le RE. Cependant aucune co-immunoprécipitation avec les STATs n'a pu être détectée. Nous avons aussi analysé la conséquence de la rétention totale de KIT<sup>D816V</sup> dans le RE suite à un traitement à la brefeldine A. Ce traitement est extrêmement toxique pour les cellules HMC-1.2 qui sont habituellement relativement résistantes aux traitements par des inhibiteurs chimiques. Ce résultat n'était pas très encourageant. Nous ignorons encore si STAT5 est encore phosphorylé suite à ce traitement comme décrit dans le cas de la rétention de FLT3-ITD dans le RE <sup>385</sup>.

Nous pensons que la compréhension fine des mécanismes moléculaires et de l'implication fonctionnelle de l'activation oncogénique des protéines STATs par les formes oncogéniques de KIT est indispensable pour l'amélioration des traitements à venir pour les patients atteints de néoplasies dépendantes de KIT.

#### **1-D- Manuscrit: « Mechanisms of STAT protein activation by oncogenic KIT mutants in neoplastic mast cells »**

**MECHANISMS OF STAT PROTEINS ACTIVATION BY ONCOGENIC KIT MUTANTS IN  
NEOPLASTIC MAST CELLS\***

**Amandine Chaix<sup>1,2,3</sup>, Sophie Lopez<sup>1,2,3</sup>, Edwige Voisset<sup>1,2,3</sup>, Laurent Gros<sup>4</sup>, Patrice Dubreuil<sup>1,2,3</sup> and  
Paulo De Sepulveda<sup>1,2,3</sup>**

From INSERM, U891, Centre de Recherche en Cancérologie de Marseille<sup>1</sup>; Institut Paoli-Calmettes<sup>2</sup>;  
Université de la Méditerranée<sup>3</sup>, Marseille, France; AB Science<sup>4</sup>, Paris, France.

Running head: Activation of STATs by KIT mutant

Corresponding author: Paulo De Sepulveda, INSERM U891, 27 Boulevard Lei Roure BP30059, 13273,  
Marseille Cedex 9, France. Phone: 33 4 91758276. Fax: 33 4 260364. E-mail : [paulo.de-sepulveda@inserm.fr](mailto:paulo.de-sepulveda@inserm.fr)

**Mutations in the *c-kit* gene occur in the vast majority of mastocytosis. In adult patients as well as in cell line derived from mast cell neoplasms, the mutations occur almost exclusively at amino-acid 816 within the kinase domain of KIT. Among the downstream effectors of KIT signalling, STAT3 and STAT5 have been shown to be critical for cell proliferation elicited by KIT-D816 mutant protein. However, little is known about the mechanisms of STAT proteins activation. In this study, we identify and clarify the contribution of various STAT kinases in two widely used neoplastic mast cell lines, P815 and HMC-1. We show that STAT1, STAT3 and STAT5 proteins are activated downstream of KIT-D816 mutant. All three STAT proteins are located in the nucleus and are phosphorylated on serine residues. KIT-D816 mutant can directly phosphorylate STATs on the activation-specific tyrosine residues *in vitro*. However, within cells, SRC family kinases and JAK kinases diversely contribute to tyrosine phosphorylation of STAT proteins downstream of KIT mutant. Using a panel of inhibitors we provide evidence for the implication or exclusion of serine/threonine kinases as responsible for serine phosphorylation of STAT1, STAT3 and STAT5 in the two cell lines. Finally, we show that only STAT5 is transcriptionally active in these cells. This suggests that the contribution of STAT1 and STAT3 downstream of KIT mutant is independent of their transcription factor function.**

The growth factor Stem Cell Factor (SCF)<sup>#</sup> and its receptor KIT play a pivotal role in the development of haematopoietic cells, germ cells, interstitial cells of Cajal and melanoblasts.

Perturbations of either SCF or KIT physiological functions contribute to human neoplasms related to these cells such as mastocytosis, acute myeloid leukemia, germ cell tumors, gastro-intestinal stromal tumors (GISTs) and melanoma (1). The most common dysfunction of the SCF/KIT pathway are mutations in the *c-kit* gene which affect residues or domains involved in the inactive to active conformation transition, thus leading to the constitutive activation of the receptor (2). Among them, mutations in the juxtamembrane domain are found in the majority of GISTs (3), and in some melanomas (4), whereas substitution of aspartic acid 816 (Asp 814 in the mouse) is found in about 80% of mastocytosis patients (5,6) and in some cases of acute myeloid leukemias (AML) (7,8) and melanomas, in testicular germ cell tumors (9-11).

KIT signals through the recruitment of proteins on its intracellular docking sites thereby inducing the formation of a large multiprotein signalling complex. Known signalling pathways activated by wild-type (WT) KIT include PI3K/AKT, RAS-ERK, the SRC family kinases (SFK), PLC $\gamma$  and JAK/STAT pathways (1,12). Signal Transducers and Activators of Transcription (STAT) proteins are latent cytoplasmic transcription factors that transduce the effects of a broad range of hormones, cytokines and growth factors on target gene expression. There are seven mammalian STAT proteins (STAT1, -2, -3, -4, -5A, -5B and -6) that all share the same arrangement of functional motifs. STAT proteins become activated upon tyrosine phosphorylation and are subsequently translocated into the nucleus where they act on target gene promoters (13).

Constitutive activation of STAT proteins has been demonstrated in various leukaemias (14,15). In normal signalling, STAT activation is rapid and transient. In contrast, aberrant permanent

STAT activation has been associated with malignant progression in both solid tumors and blood malignancies (14,15). This activation is associated with the persistent activity of oncogenic PTK and has been shown to be directly linked to cellular transformation. For example, STAT3 activation directly participates in the transformation by SRC oncoprotein (16) and STAT5 activation is essential for the transformation by BCR-Abl oncogenic fusion protein (17).

STAT3 and STAT5 have been shown to be essential for cell proliferation in the context of KIT Asp816 gain-of-function (GOF) mutant, in cell lines or in activated mastocytes from patients with systemic mastocytosis (18-20). However, the pathways linking KIT receptor to STAT phosphorylation and activation remain unknown. This study was undertaken to delineate the mechanisms of STAT proteins activation downstream of KIT GOF mutants in the commonly used mast-cell leukaemia cell lines P815 and HMC-1.

### Experimental procedures

*Cells-* P815 and FMA3 are mouse mastocytoma cell lines carrying endogenous activating KIT-D814Y mutation and juxtamembrane deletion, respectively. The Human Mast Cell leukaemia cell line HMC-1 carrying the two point mutations V560G and D816V (HMC1.2) was kindly provided by Dr J.H.Butterfield (21). TF1 KIT-D816V and MO7e KIT-D816V cells are cytokine independent stable transfectants expressing KIT-D816V receptor, obtained respectively from parental TF1 and MO7e cells, two human cytokine-dependent haematopoietic cell lines. All cells were grown in RPMI 1640 medium supplemented with 10% heat-inactivated foetal bovine serum (FBS). All reagents were from Invitrogen (Carlsbad, CA). Primary cultures of bone-marrow-derived mast cells (BMMC) from wild-type mice were prepared and maintained in OPTI-MEM medium with 10% FBS, 2mM glutamine, 50 $\mu$ M  $\beta$ -mercaptoethanol and 1% conditioned medium from BHK cell cultures which express murine IL3. SCF stimulations were done with 250ng/ml mSCF (Peprotech). BMMC derived from transgenic mice expressing KIT-D816V were grown in BMMC media without

exogenous IL-3 (22). COS-7 cells were grown in DMEM medium with 10% FBS, 1mM sodium pyruvate.

*Antibodies and Inhibitors-* Anti-AKT, anti-phospho-AKT (Ser473), anti-KIT, anti-phospho-KIT (Tyr719), anti-phospho-STAT1 (Tyr701), anti-phospho-STAT3 (Tyr705), anti-phospho-STAT5 (Tyr694) rabbit polyclonal antibodies were from Cell Signalling Technology (Beverly, MA). Anti-HDAC8 mouse monoclonal antibody, anti-ERK2, anti-STAT1, anti-STAT3, anti-STAT5 rabbit polyclonal antibodies were from Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg, Germany). Anti-active pan-ERK (Thr202/Tyr204) rabbit polyclonal antibody was from Promega (Madison, WI). Anti-phospho-LYN (Tyr396) rabbit monoclonal antibody was from Epitomics (Burlingame, CA). Anti-KIT mouse monoclonal antibody (MAB332) was from RnD Systems. Anti-phospho-Tyrosine mouse monoclonal (clone 4G10), anti-phospho-STAT1 (Ser727) and anti-phospho-STAT5A/B (Ser726/731) rabbit antiserum, anti-JAK3 rabbit antiserum recognizing murine JAK3 and anti-human JAK3 C-Terminus were from Upstate, Millipore. Anti-phospho-STAT3 (Ser727) mouse monoclonal antibody (MAB3705) was from Chemicon International. Anti-Tubuline mouse monoclonal was from SIGMA-Aldrich (St Louis, MO).

Dasatinib (BMS) was purchased from Sequoia Research Product. Jak InhibitorI (pan JAK inhibitor), SB203580 (p38MAPK inhibitor), SU6656 (SFK inhibitor) and U0126 (MEK1/2 inhibitor) were purchased from Calbiochem (Merck Chemicals Ltd, Nottingham,UK). Bisindolylmaleimide, H-89, KN-93 and PKG inhibitor are from the "serine/threonine kinases inhibitor set" (Calbiochem). SB216763 (GSK3 inhibitor) was purchased from Sigma-Aldrich (St Louis, MO).

*Immunoprecipitation, Peptide pull down and Western blotting-* Before SCF stimulation, BMMCs were starved in OPTI-MEM, 0.5% FCS and 1% bovine serum albumin (BSA) for 4 hours. Prior to chemical treatment, P815 and HMC-1 cells were starved in RPMI 1640 medium with 0.5% FCS for 3 hours.

Cells were lysed at 4°C in ice-cold "HNTG" lysis buffer (50mM Hepes [pH 7], 150mM NaCl, 1mM

EGTA, 1,5mM MgCl<sub>2</sub>, 1% Triton X-100, 10% Glycerol, 0,2% NaF, 1mM orthovanadate, protease inhibitors cocktail (Complete Tablets; Roche Applied Science, Mannheim, Germany). Insoluble material was removed by centrifugation at 15 000g for 30 minutes at 4°C. The cell lysate protein concentrations were assessed with the Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad Laboratories). Immunoprecipitation were performed with 1 mg of protein lysates, 1µg of antibody and 10 µl (bed volume) of protein A-sepharose beads (Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden).

For peptide pull-down experiments, 15-mer peptides corresponding to amino-acid 563 to 577 of hKIT INGNNYVYIDPTQLP (Eurogentec) comprising phosphorylated or unphosphorylated Y568/Y570 were coupled to N-hydroxysuccinimide (NHS)-activated sepharose beads (Amersham Biosciences) and incubated with cell lysates for 2 hours at 4°C.

Lysates, immunoprecipitates, or affinity complexes were resolved by SDS-PAGE and transferred onto PVDF membrane (Immobilon-P; Millipore) followed by western blotting with specific antibodies. Signals were revealed using West pico chemiluminescent substrate (Pierce, Rockford, IL).

*Vectors, siRNA and transfections-* The vectors used for COS-7 transfection are pcDNA3-KIT-WT and pcDNA3-KIT-D816V. The following vectors were used for the production of STAT fusion proteins used in *in vitro* kinase assay: pGEX-STAT1 (a gift from Drs Ali and Sayeski, (23)), pGEX-STAT3 (a gift from Drs Cao and Cheh Peng, (24)), pGEX-STAT5A (aa494-793) (a gift from Dr Ikuta, (25)). pGEX-STAT5A-Y694F was obtained by site-directed mutagenesis using QuickChange Kit (Stratagene) according to the manufacturer's instructions. The following vectors were used for STAT luciferase reporter assay: pGAS-Luc (Stratagene), p4xTSV-Luc containing the core region of the LIF-response element of the rat  $\alpha$ 2M gene (a gift from F.Gouilleux and G.M. Hocke (26)), p $\beta$ CAS-Luc (a gift from W.Leonard (27)) to monitor STAT1, STAT3 and STAT5 activities respectively. pRL-TK expressing Renilla luciferase was used as control in the transfection experiments (Promega). Luciferase activities in the figures are expressed as arbitrary units relative to control Renilla luciferase.

COS-7 cells were transfected with FUGENE6 transfection reagent (Roche Diagnostics, Penzberg, Germany) according to the manufacturer's protocol. HMC-1 and P815 cells were transfected by electroporation with a Xcell pulser (Bio-Rad Laboratories, Munich, Germany).  $8 \times 10^6$  cells in 500µl RPMI 1640 medium were chocked in 4 mm electroporation cuvettes at 250V and 950µF for HMC-1 cells and 280V and 950µF for P815 cells. JAK3 knock-down was obtained with siRNA from Dharmacon (ON-TARGET plus SMART-pool). For siRNA knockdown, 0.4 nmol of siRNA was used for each electroporation.

*In vitro Kinase Assay-* Purified KIT-D816V and SRC kinases are a gift from L. Gros (AB Science). They were obtained from a baculovirus expression system and purified as described (28). Vectors expressing GST-STAT fusion proteins were transformed in the Rosetta<sup>TM</sup> E. coli strain (MERCK). Fusion proteins were purified and eluted by GST-glutathione affinity chromatography (Glutathione Sepharose 4 Fast Flow, GE Healthcare).

*In vitro kinase assay* were performed with the indicated quantity of enzymes and substrates in presence of an excess of ATP (250µM). Reactions were carried out in kinase buffer (50mM Hepes pH 7,8, 10mM MgCl<sub>2</sub>, 2mM MnCl<sub>2</sub>, Brij 0,01%) at room temperature and stopped after one hour by adding 50mM EDTA. GST-STAT substrates were then collected in wells coated with anti-GST antibodies (GST-Tag Antibody Plate, Novagen), binding was allowed for one hour followed by three washes in PBS-0,05% Tween. Substrate phosphorylation was then revealed by detecting the binding of the primary anti-phospho-tyrosine-Stat1/3/5 antibodies (Cell Signalling Technology, 200e) with a secondary anti-rabbit HRP conjugated antibody (10 000e) and incubation with tetramethylbenzidine (TMB substrate reagent, R&D Systems, Minneapolis). The final reaction product was quantified by spectrophotometry at 450 nm.

*STAT luciferase reporter assay-* COS-7 cells were transfected with a plasmid containing WT KIT or KIT-D816V, a STAT firefly luciferase reporter plasmid and a control renilla luciferase plasmid in a 1:1:0.2 ratio using FUGENE6 according to the protocol described above. The total amount of

plasmid DNA used was 3.3  $\mu$ g to transfect  $3.10^5$  cells. Each transfection was done in triplicate. Luciferase activity was determined twenty-four hours after transfection.

HMC-1 and P815 were transfected by electroporation as described above. The STAT reporter plasmid and control plasmid ratio used was 10:1 and the total amount of transfected DNA was 5.5  $\mu$ g. Immediately after electroporation, each cuvette was split in two and cells were grown for 6 hours with 1 $\mu$ M dasatinib or with equivalent volume of DMSO as a control.

The luciferase activity was determined using a Dual-Luciferase Reporter Assay Kit (Promega). Each measure was done in triplicate. In all figures, specific STAT activity is represented as the ratio of firefly-luciferase (F-luc) over renilla-luciferase (R-luc) activity for 10  $\mu$ g of cell lysates proteins.

*Cellular fractionation-* HMC-1 cells were treated with hypotonic buffer (25 mM Hepes, 5mM KCl, 0.5mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM DTT, 0.5% NP-40, protease inhibitor cocktail). Cytoplasmic and nuclei fractions were separated by centrifugation for one minute at 1200 g. Pelleted nuclei were suspended in hypertonic buffer (25 mM Hepes, 350mM NaCl, 10% sucrose, 1mM DTT, 0.5% NP-40, protease inhibitor cocktail) and cleared protein extracts were obtained following 1 hour shacking at 4°C and centrifugation at 16000g for 10min.

## RESULTS

*The regulated transient tyrosine phosphorylation of STATs by wild-type KIT is constitutive downstream of KIT gain-of-function mutants.*

We have previously reported a robust tyrosine phosphorylation of STAT1, -3 and -5 downstream of the juxtamembrane gain-of-function mutants of KIT (29). With regards to KIT kinase-domain mutant, the most frequent mutant of KIT in mast cells (i.e. KIT mutated at position D816), several groups have reported phosphorylation of either STAT1, STAT3 or STAT5 family members using various transfected cell models (18,19,29-32). To determine whether the tyrosine phosphorylation of STAT1, STAT3 and STAT5A/B was a feature of neoplastic mast cells, we analysed their phosphorylation status in commonly used mast cell lines. HMC-1 is a human mast cell leukaemia cell line carrying two activating point mutations at

codons 560 and 816 in the *c-kit* gene. P815 and FMA3 are murine mastocytoma cell lines carrying the murine D814Y mutation homologous to human D816V and an in-frame deletion in the juxtamembrane inhibitory domain of *c-kit*, respectively. Constitutive tyrosine phosphorylation of STAT1, -3 and -5 was observed in all three cell lines (Fig. 1A).

To establish whether KIT is upstream of STATs phosphorylation in the neoplastic mast cell lines P815 and HMC-1, we used an inhibitor of KIT kinase activity. KIT-D816 mutant is resistant to imatinib but dasatinib sensitive (33,34). Dasatinib treatment resulted in a complete inhibition of the phosphorylation of all three STATs (Figure 1B), suggesting that KIT signalling is responsible for STAT proteins activation in P815 and HMC-1.

To demonstrate that KIT kinase mutant induced the phosphorylation of STAT proteins, KIT-D816V was transfected in two human hematopoietic cell lines MO7e and TF1 in which STAT1, -3 and -5 tyrosine phosphorylation was minimal in the absence of cytokine stimulation. As shown in figure 1C, STAT proteins phosphorylation is minimal in the parental cells, while KIT transfected cells show robust phosphorylation of all three STAT proteins. In conclusion, KIT kinase mutants found in neoplastic mast cells all lead to the downstream constitutive tyrosine phosphorylation of STAT1, STAT3 and STAT5.

Finally, we asked whether STAT proteins phosphorylation was a pathway activated by wild-type KIT signalling in primary mast cells. To evaluate the activation of STAT1, -3 and -5 upon SCF stimulation, murine primary bone-marrow derived mast cells (BMMC) were stimulated with SCF and lysates were analysed by western blotting with phospho-specific antibodies. As seen in figure 1D, STAT1, STAT3 and STAT5 were phosphorylated on their activation-specific tyrosine Y701, Y704, Y694 respectively following KIT stimulation. The kinetics of phosphorylation was rapid and transient, peaking at 5 minutes and down-regulated within approximately 15 minutes. We also derived BMMC obtained from KIT-D816 transgenic mice (22). In these primary cells, the persistent activation of STAT proteins was also observed, while AKT and ERK pathways were downregulated as in the context of wild type KIT stimulation, showing the distinctive feature of

STAT proteins activation (Figure 1D, last lane). Thus, under KIT GOF mutants, the STAT pathway is not down-modulated as upon WT KIT stimulation, resulting in permanent tyrosine phosphorylation of STAT1, STAT3 and STAT5.

*Contribution of SFK and JAK kinases to STAT tyrosine phosphorylation.*

To identify the STAT kinases downstream of KIT in neoplastic mast cells, we used a candidate approach. The kinases responsible for the tyrosine phosphorylation of STATs include the cytosolic kinases of the Janus (JAK) or SRC family (SFK). STAT proteins phosphorylation can also occur through direct phosphorylation by an upstream receptor tyrosine kinase (RTK) as described for FGFR3 (35), PDGFR (36) (37) or FLT3 (38).

First, we asked whether JAK kinases were involved in STATs activation. Members of JAK family kinases have been previously shown to be phosphorylated in the HMC-1 cell line (39) and Fig 2A). In our experiments, JAK3 is the main JAK kinase activated in P815 and HMC-1, and its phosphorylation is dependent on KIT catalytic activity (data not shown). The treatment of P815 cells with Jak Inhibitor I, a potent inhibitor of JAK1, JAK2, JAK3 and Tyk2, resulted in inhibition of JAK3 autophosphorylation (Figure 2A, upper panels) but had no influence on STAT1, -3 and -5 tyrosine phosphorylation (Figure 2A, lower panels). The same result was obtained following JAK3 expression knockdown using RNA interference in P815 cells (supplementary Fig.1). These results suggest that STATs phosphorylation is independent of JAK kinases activity in P815. In HMC-1 cells, a reduction of phosphorylation of STAT1 and STAT5 was observed, showing a contribution of JAK kinases to STAT1, -3 and -5 activation (Figure 2B). Unlike in P815, JAK inhibition in HMC-1 resulted in decreased SFK Y416 phosphorylation.

Secondly, to determine the implication of SFK, we conducted the same experiments using the selective inhibitor SU6656. As shown on Figure 2C, the treatment of both P815 and HMC-1 cells resulted in the total disappearance of phospho-STAT1 and a partial reduction of phospho-STAT3. Phospho-STAT5 was not affected by SFK inhibition in both cells. These results suggest an implication of SFK in STAT1 and STAT3

phosphorylation but not in the activation of STAT5.

*KIT phosphorylates STAT1, STAT3 and STAT5 in vitro.*

We next sought to determine whether KIT-D816V could directly phosphorylate STAT proteins as demonstrated for some other RTKs. We used an *in vitro* kinase assay coupled with an ELISA detection system to assess STAT1, STAT3 and STAT5 phosphorylation. *In vitro* kinase assays were performed using purified KIT-D816V and GST-STAT fusion proteins as substrates. Kinase assays were performed in excess of ATP (250 $\mu$ M) and substrates (400nM) and increasing concentration of enzyme. Substrate phosphorylation was revealed using specific STAT anti-phosphotyrosine antibodies. As seen in Figure 3A (upper panel), the tyrosine phosphorylation of all three STATs increased with KIT-D816V protein concentration. As a control, the tyrosine mutant GST-STAT5-Y694F did not show phosphorylation in this assay or in control western-blot (Figure 3B). Thus, KIT-D816V phosphorylated all three STATs *in vitro* at the conserved tyrosine residue.

*Intrinsic kinase properties of KIT-D816V and SRC may account for STAT substrate selectivity.*

Having shown that KIT-D816V and SFK differentially contribute to STATs tyrosine phosphorylation in cells, we asked whether this could be explained by the intrinsic catalytic properties of the kinases towards STAT substrates. To address this question, we performed kinase assays to determine SRC and KIT-D816V kinetic parameters towards the different STAT substrates. Enzyme titration assays were performed in excess of substrates to settle the appropriate amount of recombinant enzyme to use in the assays. As seen on figure 3A (lower panel), GST-STAT phosphorylation displayed a linear increase followed by saturation as the concentration of SRC was raised. For KIT-D816V, saturation was reached for STAT3 but remained linear for STAT1 and STAT5. For each enzyme, the quantity of KIT and SRC enzymes was chosen in the linear part of the curves, that is, 1  $\mu$ g for both enzymes. The phosphorylation states of the different GST-STAT proteins by SRC and KIT-D816V were then compared using the set enzyme quantity, in one

hour with increasing concentration of STAT substrates. As seen on figure 3C, phosphorylation of each STAT fusion proteins increased with substrate concentration, and the reactions followed Michaelis-Menten kinetics. For STAT3 phosphorylation, KIT and SRC kinases showed overlapping kinetics indicating similar enzyme kinetics parameters ( $V_{max}$  and  $K_m$ ). Regarding STAT1 phosphorylation, SRC kinase showed higher  $V_{max}$  and lower  $K_m$  than KIT which indicated that SRC is more efficient than KIT for STAT1 tyrosine phosphorylation. Finally, STAT5 phosphorylation kinetics show very different enzymatic parameters with lower  $K_m$  for KIT but higher  $V_{max}$  for SRC, therefore the comparison of SRC and KIT efficiencies to phosphorylate STAT5 *in vitro* are not conclusive. In conclusion, the enzymatic parameters may account for the contribution of SRC in STAT1 phosphorylation and for the cooperative effect of SRC and KIT on STAT3 phosphorylation observed in cells.

#### *Endogenous interactions of KIT-D816V with STAT1, -3 and -5.*

Having shown that KIT-D816 mutant can phosphorylate STAT proteins *in vitro*, we asked whether STAT1, STAT3 and STAT5 were part of the KIT-D816V receptor signalling complex. KIT-D816V was immunoprecipitated from HMC-1 cells and co-precipitated proteins were probed for STATs by western blotting using specific antibodies. As seen on Figure 4A (left panel), KIT-D816V co-immunoprecipitated with STAT1, STAT3 and STAT5. Furthermore, these interactions were dependent on KIT-D816V catalytic activity as they were lost or severely diminished when the kinase activity of the receptor was abolished with dasatinib treatment. Interestingly, SFK kinases were also part of this complex (Fig. 4A, right panel).

The di-tyrosine motif Y589-Y591 within the juxtamembrane domain of FLT3-ITD has been involved in STAT5 activation (40). Furthermore, the homologous motif in KIT is thought to recruit SFK (41). We assumed that this docking site on KIT, consisting of human tyrosines 568 and 570, could also be implicated in STAT binding. We performed affinity pull-down assays with synthetic peptides containing the di-tyrosine motif either in a non phosphorylated form or in one of the three possible phosphorylated state - i.e.

phosphotyrosine 568 alone (pY568), phosphotyrosine 570 alone (pY570) or both 568-570 tyrosines phosphorylated (pY568pY570). As seen Figure 4B, STAT1, STAT3 and STAT5 bound to the phosphorylated peptides. The interaction was phosphorylation dependent as shown by the control non-phosphorylated peptide (Y568Y560). These results suggest that STAT proteins are part of the KIT receptor signalling complex and that the recruitment of STAT proteins occur in the juxtamembrane di-tyrosine motif Y568Y570.

#### *STAT5 is transcriptionally active in the neoplastic mast cells whereas STAT1 and STAT3 are not.*

STAT tyrosine phosphorylation is required for their translocation to the nucleus and thus for their activation as transcription factors. We used a luciferase-based reporter assay to test STAT transcriptional activity downstream of KIT-D816V. Cells were transfected with reporter plasmids expressing firefly luciferase under the control of promoters containing STAT1, STAT-3 or STAT5 responsive elements, together with a control plasmid encoding renilla luciferase driven by the ubiquitous TK promoter. To validate the assay, the KIT mutant cDNA and the reporter constructs were first transfected in COS-7 cells. Transient transfection of KIT-D816V in COS cells lead to robust STAT protein phosphorylation (data not shown). As seen on Figure 5A, KIT-D816V ectopic expression in COS-7 cells led to the activation of all three STAT reporter constructs. This experiment indicated that KIT-D816V can activate STAT1, -3 and -5 transcriptional activity. We then addressed whether STAT proteins were transcriptionally active in the mastocyte cell lines. The same experiment as above was performed in P815 (Fig. 5B) and HMC-1 (Fig. 5C) cells. As shown in figure 5B and 5C, STAT5 reporter was active in both cell types and this activity was dependent on KIT-D816V kinase activity as revealed by Dasatinib treatment. By contrast, we could not detect any transcriptional activity of neither STAT1 nor STAT3 reporters in those cells. In conclusion, KIT-D816V can activate STAT1, -3 and -5, but only STAT5 is transcriptionally active in P815 and HMC-1 mast cells.

#### *Serine phosphorylation and nuclear localization of STATs in neoplastic mast cell lines.*

Additional serine phosphorylation in the C-terminal transactivation domain of STAT proteins is necessary for full transcriptional activity (42). Since STAT1 and STAT3 were not active, we asked whether they were phosphorylated on the specific serine residues. As shown in figure 6A, STAT1, -3 and STAT5 are phosphorylated on their conserved serine 727, 727 and 726/731 respectively, both in P815 and HMC-1 cells. Furthermore, the inhibition of KIT-D816V activity led to the disappearance of phospho-serine STAT3 and STAT5 in both cells showing that these phosphorylations are KIT dependent. By contrast, STAT1 serine phosphorylation is basal and independent of KIT catalytic activity.

To further delineate the pathways responsible for STATs serine phosphorylation, we applied a systematic approach using chemical inhibitors. The MAPK family kinases were targeted either with U0126 to inhibit MEK1/2 and as a consequence the ERK pathway or with SB203580 to inhibit the p38 pathway. We also used KN-93 to inhibit CaMKII, Bisindolylmaleimide, H-89 and Protein Kinase G Inhibitor to target PKC, PKA and PKG respectively, and SB216763 to inhibit GSK3. All these inhibitors were used at the minimal dose required to inhibit the respective kinases (43). As shown on figure 6B, treatment of both P815 and HMC-1 with U0126 resulted in the inhibition STAT3 serine-phosphorylation, with no effect on STAT1 and STAT5. A reduction of STAT5 serine-phosphorylation was observed with treatment of Bisindolylmaleimide (Figure 6C). Thus, ERK and PKC pathway are likely to be involved in STAT3 and STAT5 serine-phosphorylation, respectively, downstream of KIT-D816V. The other inhibitors had no effect on STAT serine-phosphorylation (supplementary figure 2).

As all three STATs were phosphorylated on tyrosine and serine residues, but only STAT5 was transcriptionally active, we finally checked their nuclear localization in HMC-1 cells. We performed cellular fractionation, and as shown in Figure 6D, all STATs were found both in cytoplasm and nucleus. Furthermore, we observed an enrichment of the tyrosine-phosphorylated forms in the nuclear fraction compared to the cytoplasmic one, with phosphotyrosine STAT5 only detectable in the nuclear fraction. Thus, neither serine phosphorylation nor nuclear localisation could account for the observed

absence of transcriptional activity of STAT1 and STAT3.

## DISCUSSION

We show here that KIT is responsible for the permanent phosphorylation of all three STAT proteins STAT1, STAT3 and STAT5 in P815 and HMC-1 cell lines with diverse contributions of SFK and JAK kinases depending on the STAT protein and on the cell line. We also report the involvement of ERK MAP-Kinases and PKC for serine phosphorylation of STAT3 and STAT5 respectively downstream of KIT in the two cell lines. Importantly, only STAT5 showed transcriptional activity both in P815 and HMC-1 cells. Overall, similar results and conclusions were reached for both murine P815 and human HMC-1 cells. However, a crucial difference was pointed out regarding the implication of JAK kinases restricted to HMC-1 cells.

We had previously reported the constitutive tyrosine phosphorylation of STAT1, -3 and -5 by KIT juxtamembrane mutants, i.e. regulatory type mutants mostly found in GIST tumors (29). In neoplastic mast cells, the most common KIT alteration is the kinase domain substitution D816 by a valine residue. This mutant is also found in germ cell tumors (9-11) and in AML (7,8). Previous studies have reported the activation of STAT1 or STAT3 by KIT-D816V in transfected cell lines (18,30,44), however very few have addressed the activation of STAT in neoplastic cells. A noticeable exception is a recent description of STAT5 activation and STAT5 requirement for cell proliferation in HMC-1 cells (19). Our study is the most exhaustive description of STAT1, -3 and -5 proteins phosphorylation and activation in the commonly used neoplastic mast cells. Overall, it seems that KIT juxtamembrane and kinase domain mutants activate all three STAT proteins. The wild-type KIT receptor can transiently activate STAT proteins. Hence, these pathways are not unique to mutants. However, they are downregulated in the wild-type stimulation while they are permanently activated in the mutant receptor context. Therefore, we believe that STAT activation downstream of mutant KIT can be called aberrant as it is in other pathologic situations. Whether the permanent activation is due

to an alternative activation route or to the loss of a negative feedback loop remains to be determined.

Aberrant STAT proteins activation has been found in numerous leukaemias and other cancers, and STAT activation is thought to contribute to neoplasia (14). As a consequence, STAT proteins are attractive therapeutic targets. Several strategies have been proposed to target various aspects of STAT protein activation or STAT function. These include targeting STAT recruitment to receptors or oncogenic proteins, inhibition of STAT kinases, activation of STAT inhibitors and interference with STAT protein dimerization, nuclear transport or DNA binding (45,46). Therefore, it is extremely important to understand the pathways of STAT activation and the STAT function implicated in each disease to choose the appropriate STAT targeting strategy. While some of the questions raised in this study have been partially addressed before, the work presented here is the most extensive undertaken so far on the mechanism of STAT protein activation in neoplastic mast cell lines.

In the conventional JAK-STAT signalling pathway, the triggering of the cytokine receptor causes STAT tyrosine phosphorylation by the receptor-associated JAK tyrosine kinase (47). However, receptors with intrinsic tyrosine kinase activity can also directly phosphorylate STATs, as described for STAT1 phosphorylation by PDGFR (36) or STAT5 phosphorylation by PDGFR (37) and IR (48). This activation can also be indirect via the recruitment of cytosolic protein tyrosine kinases (PTK). Amongst the latter, members of the SFK are well described STAT tyrosine phosphorylation actors in physiological (49) or pathological context (50). Our data combining observations done in cells together with *in vitro* kinase assays suggest differential roles for JAK, SFK and KIT for STAT tyrosine phosphorylation. In murine mastocytoma P815, SFK are the main STAT1 tyrosine kinase, while SFK and KIT cooperate to phosphorylate STAT3, and KIT is the main candidate as STAT5 kinase. In human mast cell leukaemia cell line HMC-1, we reached the same conclusion for the contribution of SFK, but in these cells the activation of SFK are in part dependent on JAK kinases. As mentioned above, the contribution of JAK kinases upstream of SFK is the main difference we found between P815 and HMC-1.

Our kinase assays suggest that KIT is a STAT1, STAT3 and STAT5 kinase *in vitro*. This was previously shown by Deberry and colleagues for STAT1 (51). We have shown for the first time a physical interaction of KIT with all three STAT endogenous proteins in HMC-1 cells, which suggest that STAT proteins could also be KIT substrates within cells as well. However, the suspected site of interaction, a di-tyrosine motif in KIT juxtamembrane region, is a docking site involved in the recruitment of many signalling proteins including docking molecules such as SHP2 (52) as well as SFK (41). Therefore, this site is involved in the formation of a multiprotein signalling receptor complex which includes other potential STAT kinases. Interestingly, the homologous site in the closely related receptors FLT3 and PDGFR was implicated in STAT5 activation by the oncogenic mutants FLT3-ITD and TEL-PDGFR $\beta$ , respectively (40,53). Unlike in the context of KIT mutant receptors, in the case of FLT3-ITD, only STAT5 is activated, but as for KIT the phosphorylation of STAT5 is thought to be independent of SFK and JAK kinases. Therefore, there are both similarities and differences in the activation of STAT proteins by these related mutant receptors.

In our experiments, JAK3 but not JAK2 is activated downstream of KIT in the two mast cell-lines (Fig. 2). It is of interest to note that JAK1 and JAK3 have been implicated in the phosphorylation of STAT proteins in the closely related HMC-1.1 cell line which was derived from the original HMC-1 (39). Although not obtained with the same cells, these results support a model implicating JAK kinases in the phosphorylation of STAT proteins in HMC-1.

We did not identify which member of SFK is involved in STATs phosphorylation in P815 and HMC-1. The inhibitors used here do not discriminate among family members. LYN is one candidate as it is activated downstream of KIT in both cell lines. We knocked-down LYN expression by RNA interference in HMC-1 and found no differences in STATs phosphorylation status, excluding LYN as the major STAT kinase (data not shown).

In addition to tyrosine phosphorylation, serine phosphorylation is required for the full transcription activation of STAT proteins (42). The conserved serine is located in the transactivation

domain of STAT proteins and embedded in a PMSP motif, a potential consensus sites for MAP-kinases. In P815 and HMC-1 cells, all three STAT proteins were phosphorylated at the conserved serine residue. STAT1 serine phosphorylation was constitutive in these cells independently of KIT activation, whereas STAT3 and STAT5 serine phosphorylation was dependent on KIT kinase activity. In line with several other studies which concluded that MAP-kinases are bona fide STAT3 serine kinase (54), our data suggest that the MEK-ERK1/2 pathway is involved in STAT3 serine phosphorylation both in P815 and HMC-1. For STAT5, our screen using chemical inhibitors pointed to kinases of the PKC family in both cell lines. PKCs have already been proposed as STAT kinases for STAT1 in Type-I interferon signalling and STAT3 in Insulin signalling context (55,56).

In the original paradigm of STAT signalling pathway, STAT proteins were described as direct signalling effectors connecting membrane receptors to transcription. Indeed, the activation of STAT proteins results in the expression of genes that control critical cellular functions including cell proliferation, survival, differentiation and development (13). However, recent studies on STAT protein point to more complex functions for some STAT proteins. For instance, a function of STAT3 in the mitochondria was recently discovered, in which STAT3 promoted oxidative phosphorylation and increased transformation by oncogenic Ras independently of its transcription activity (57,58). Therefore, STAT3 could contribute to KIT-D816 oncogenicity independently of its role as transcription factor.

#### REFERENCES

1. Lennartsson, J., Jelacic, T., Linnekin, D., and Shivakrupa, R. (2005) *Stem Cells* **23**, 16-43
2. Liu, H., Chen, X., Focia, P. J., and He, X. (2007) *Embo J* **26**, 891-901
3. Hirota, S., Isozaki, K., Moriyama, Y., Hashimoto, K., Nishida, T., Ishiguro, S., Kawano, K., Hanada, M., Kurata, A., Takeda, M., Muhammad Tunio, G., Matsuzawa, Y., Kanakura, Y., Shinomura, Y., and Kitamura, Y. (1998) *Science* **279**, 577-580
4. Curtin, J. A., Busam, K., Pinkel, D., and Bastian, B. C. (2006) *J Clin Oncol* **24**, 4340-4346
5. Longley, B. J., Jr., Metcalfe, D. D., Tharp, M., Wang, X., Tyrrell, L., Lu, S. Z., Heitjan, D., and Ma, Y. (1999) *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 1609-1614
6. Valent, P., Akin, C., Sperr, W. R., Mayerhofer, M., Fodinger, M., Fritsche-Polanz, R., Sotlar, K., Escribano, L., Arock, M., Horny, H. P., and Metcalfe, D. D. (2005) *Leuk Lymphoma* **46**, 35-48
7. Beghini, A., Ripamonti, C. B., Cairoli, R., Cazzaniga, G., Colapietro, P., Elice, F., Nadali, G., Grillo, G., Haas, O. A., Biondi, A., Morra, E., and Larizza, L. (2004) *Haematologica* **89**, 920-925
8. Cairoli, R., Beghini, A., Grillo, G., Nadali, G., Elice, F., Ripamonti, C. B., Colapietro, P., Nichelatti, M., Pezzetti, L., Lunghi, M., Cuneo, A., Viola, A., Ferrara, F., Lazzarino, M., Rodeghiero, F., Pizzolo, G., Larizza, L., and Morra, E. (2006) *Blood* **107**, 3463-3468
9. Tian, Q., Frierson, H. F., Jr., Krystal, G. W., and Moskaluk, C. A. (1999) *Am J Pathol* **154**, 1643-1647
10. Looijenga, L. H., de Leeuw, H., van Oorschot, M., van Gurp, R. J., Stoop, H., Gillis, A. J., de Gouveia Brazao, C. A., Weber, R. F., Kirkels, W. J., van Dijk, T., von Lindern, M., Valk, P., Lajos, G., Olah, E., Nesland, J. M., Fossa, S. D., and Oosterhuis, J. W. (2003) *Cancer Res* **63**, 7674-7678

11. Kemmer, K., Corless, C. L., Fletcher, J. A., McGreevey, L., Haley, A., Griffith, D., Cummings, O. W., Wait, C., Town, A., and Heinrich, M. C. (2004) *Am J Pathol* **164**, 305-313
12. Ronnstrand, L. (2004) *Cell Mol Life Sci* **61**, 2535-2548
13. Levy, D. E., and Darnell, J. E., Jr. (2002) *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**, 651-662
14. Bowman, T., Garcia, R., Turkson, J., and Jove, R. (2000) *Oncogene* **19**, 2474-2488
15. Benekli, M., Baer, M. R., Baumann, H., and Wetzler, M. (2003) *Blood* **101**, 2940-2954
16. Bromberg, J. F., Horvath, C. M., Besser, D., Lathem, W. W., and Darnell, J. E., Jr. (1998) *Mol Cell Biol* **18**, 2553-2558
17. Carlesso, N., Frank, D. A., and Griffin, J. D. (1996) *J Exp Med* **183**, 811-820
18. Ning, Z. Q., Li, J., and Arceci, R. J. (2001) *Blood* **97**, 3559-3567
19. Harir, N., Boudot, C., Friedbichler, K., Sonneck, K., Kondo, R., Martin-Lanneree, S., Kenner, L., Kerenyi, M., Yahiaoui, S., Gouilleux-Gruart, V., Gondry, J., Benit, L., Dusanter-Fourt, I., Lassoued, K., Valent, P., Moriggl, R., and Gouilleux, F. (2008) *Blood* **112**, 2463-2473
20. Baumgartner, C., Cerny-Reiterer, S., Sonneck, K., Mayerhofer, M., Gleixner, K. V., Fritz, R., Kerenyi, M., Boudot, C., Gouilleux, F., Kornfeld, J. W., Sillaber, C., Moriggl, R., and Valent, P. (2009) *Am J Pathol* **175**, 2416-2429
21. Furitsu, T., Tsujimura, T., Tono, T., Ikeda, H., Kitayama, H., Koshimizu, U., Sugahara, H., Butterfield, J. H., Ashman, L. K., Kanayama, Y., and et al. (1993) *J Clin Invest* **92**, 1736-1744
22. Zappulla, J. P., Dubreuil, P., Desbois, S., Letard, S., Hamouda, N. B., Daeron, M., Delsol, G., Arock, M., and Liblau, R. S. (2005) *J Exp Med* **202**, 1635-1641
23. Ali, M. S., Sayeski, P. P., and Bernstein, K. E. (2000) *J Biol Chem* **275**, 15586-15593
24. Cao, X., Tay, A., Guy, G. R., and Tan, Y. H. (1996) *Mol Cell Biol* **16**, 1595-1603
25. Maki, K., and Ikuta, K. (2008) *J Immunol* **181**, 494-502
26. Hocke, G. M., Cui, M. Z., and Fey, G. H. (1995) *Cytokine* **7**, 491-502
27. Aman, M. J., Migone, T. S., Sasaki, A., Ascherman, D. P., Zhu, M., Soldaini, E., Imada, K., Miyajima, A., Yoshimura, A., and Leonard, W. J. (1999) *J Biol Chem* **274**, 30266-30272
28. Dubreuil, P., Letard, S., Ciufolini, M., Gros, L., Humbert, M., Casteran, N., Borge, L., Hajem, B., Lernet, A., Sippl, W., Voisset, E., Arock, M., Auclair, C., Leventhal, P. S., Mansfield, C. D., Moussy, A., and Hermine, O. (2009) *PLoS One* **4**, e7258
29. Casteran, N., De Sepulveda, P., Beslu, N., Aoubala, M., Letard, S., Lecocq, E., Rottapel, R., and Dubreuil, P. (2003) *Oncogene* **22**, 4710-4722
30. Growney, J. D., Clark, J. J., Adelsperger, J., Stone, R., Fabbro, D., Griffin, J. D., and Gilliland, D. G. (2005) *Blood* **106**, 721-724
31. Pan, J., Quintas-Cardama, A., Kantarjian, H. M., Akin, C., Manshour, T., Lamb, P., Cortes, J. E., Tefferi, A., Giles, F. J., and Verstovsek, S. (2007) *Blood* **109**, 315-322
32. Voisset, E., Lopez, S., Dubreuil, P., and De Sepulveda, P. (2007) *Blood* **110**, 2593-2599
33. Zermati, Y., De Sepulveda, P., Feger, F., Letard, S., Kersual, J., Casteran, N., Gorochoy, G., Dy, M., Ribadeau Dumas, A., Dorgham, K., Parizot, C., Bieche, Y., Vidaud, M., Lortholary, O., Arock, M., Hermine, O., and Dubreuil, P. (2003) *Oncogene* **22**, 660-664
34. Schittenhelm, M. M., Shiraga, S., Schroeder, A., Corbin, A. S., Griffith, D., Lee, F. Y., Bokemeyer, C., Deininger, M. W., Druker, B. J., and Heinrich, M. C. (2006) *Cancer Res* **66**, 473-481

35. Krejci, P., Salazar, L., Goodridge, H. S., Kashiwada, T. A., Schibler, M. J., Jelinkova, P., Thompson, L. M., and Wilcox, W. R. (2008) *J Cell Sci* **121**, 272-281
36. Vignais, M. L., and Gilman, M. (1999) *Mol Cell Biol* **19**, 3727-3735
37. Paukku, K., Valgeirsdottir, S., Saharinen, P., Bergman, M., Heldin, C. H., and Silvennoinen, O. (2000) *Biochem J* **345 Pt 3**, 759-766
38. Choudhary, C., Brandts, C., Schwable, J., Tickenbrock, L., Sargin, B., Ueker, A., Bohmer, F. D., Berdel, W. E., Muller-Tidow, C., and Serve, H. (2007) *Blood* **110**, 370-374
39. Tyner, J. W., Walters, D. K., Willis, S. G., Luttrupp, M., Oost, J., Loriaux, M., Erickson, H., Corbin, A. S., O'Hare, T., Heinrich, M. C., Deininger, M. W., and Druker, B. J. (2008) *Blood* **111**, 2238-2245
40. Rocnik, J. L., Okabe, R., Yu, J. C., Lee, B. H., Giese, N., Schenkein, D. P., and Gilliland, D. G. (2006) *Blood* **108**, 1339-1345
41. Lennartsson, J., Blume-Jensen, P., Hermanson, M., Ponten, E., Carlberg, M., and Ronnstrand, L. (1999) *Oncogene* **18**, 5546-5553
42. Wen, Z., Zhong, Z., and Darnell, J. E., Jr. (1995) *Cell* **82**, 241-250
43. Bain, J., Plater, L., Elliott, M., Shpiro, N., Hastie, C. J., McLauchlan, H., Klevernic, I., Arthur, J. S., Alessi, D. R., and Cohen, P. (2007) *Biochem J* **408**, 297-315
44. Jelacic, T., and Linnekin, D. (2005) *Blood* **105**, 1923-1929
45. Yu, H., and Jove, R. (2004) *Nat Rev Cancer* **4**, 97-105
46. Benekli, M., Baumann, H., and Wetzler, M. (2009) *J Clin Oncol* **27**, 4422-4432
47. Schindler, C., Levy, D. E., and Decker, T. (2007) *J Biol Chem* **282**, 20059-20063
48. Storz, P., Doppler, H., Pfizenmaier, K., and Muller, G. (1999) *FEBS Lett* **464**, 159-163
49. Chaturvedi, P., Reddy, M. V., and Reddy, E. P. (1998) *Oncogene* **16**, 1749-1758
50. Turkson, J., Bowman, T., Garcia, R., Caldenhoven, E., De Groot, R. P., and Jove, R. (1998) *Mol Cell Biol* **18**, 2545-2552
51. Deberry, C., Mou, S., and Linnekin, D. (1997) *Biochem J* **327 ( Pt 1)**, 73-80
52. Kozlowski, M., Larose, L., Lee, F., Le, D. M., Rottapel, R., and Siminovitch, K. A. (1998) *Mol Cell Biol* **18**, 2089-2099
53. Tomasson, M. H., Sternberg, D. W., Williams, I. R., Carroll, M., Cain, D., Aster, J. C., Ilaria, R. L., Jr., Van Etten, R. A., and Gilliland, D. G. (2000) *J Clin Invest* **105**, 423-432
54. Decker, T., and Kovarik, P. (2000) *Oncogene* **19**, 2628-2637
55. Uddin, S., Sassano, A., Deb, D. K., Verma, A., Majchrzak, B., Rahman, A., Malik, A. B., Fish, E. N., and Plataniias, L. C. (2002) *J Biol Chem* **277**, 14408-14416
56. Gartsbein, M., Alt, A., Hashimoto, K., Nakajima, K., Kuroki, T., and Tennenbaum, T. (2006) *J Cell Sci* **119**, 470-481
57. Gough, D. J., Corlett, A., Schlessinger, K., Wegrzyn, J., Larner, A. C., and Levy, D. E. (2009) *Science* **324**, 1713-1716
58. Wegrzyn, J., Potla, R., Chwae, Y. J., Sepuri, N. B., Zhang, Q., Koeck, T., Derecka, M., Szczepanek, K., Szelag, M., Gornicka, A., Moh, A., Moghaddas, S., Chen, Q., Bobbili, S., Cichy, J., Dulak, J., Baker, D. P., Wolfman, A., Stuehr, D., Hassan, M. O., Fu, X. Y., Avadhani, N., Drake, J. I., Fawcett, P., Lesniewsky, E. J., and Larner, A. C. (2009) *Science* **323**, 793-797

## FOOTNOTES

\* We thank J.H.Butterfield, F.Gouilleux, W.Leonard, X. Cao, C. Peng, E. Ponchel, B. Hajem, K. Ikuta and M.S. Ali for the gift of reagents, E. Lecocq and A. Richard for technical assistance and S. Letard for help at several steps of the project. A.C.is a recipient of PhD fellowships from Ministère de la Recherche/ENS, ARC and a financial support from SFH. E.V. was supported by INSERM-Région PACA, ARC and SFH. S.L. was supported by ANR. P.D. and P.D.S. are INSERM scientists. This project was supported by La Ligue Contre le Cancer (label Ligue 2008), l'Institut National du Cancer and l'Agence Nationale de la Recherche ANR-M-RAR.

# The abbreviations used are : SCF, Stem Cell Factor ; GIST, Gastro-Intestinal Stromal Tumors ; AML, Acute Myeloid Leukemia; WT, Wild-Type; SFK, Src Family Kinases; STAT, Signal Transducers and Activators of Transcription; GOF, Gain-Of-Function; BMMC, Bone-Marrow-derived Mast Cells.

## FIGURE LEGENDS

### Fig. 1. Constitutive activation of STAT1, -3 and -5 by oncogenic KIT.

(A) *Constitutive activation of STAT1, STAT3, and STAT5 by KIT gain-of-function mutants.* Soluble Cell Lysates (SCLs) from different mastocyte cell lines (FMA3, P815, HMC-1) were analysed for STAT1, STAT3, and STAT5 tyrosine phosphorylation by western-blotting using specific anti-phosphotyrosine antibodies as indicated.

(B) *STAT phosphorylation is dependent on KIT-D816V activity.* Starved P815 and HMC-1 cells were treated with Dasatinib (1 $\mu$ M) for 2 hours. SCLs were analysed by western-blotting using specific antibodies directed against each phospho-tyrosine of STAT. Membranes were also probed with anti-Tubulin as a control.

(C) *Ectopic expression of KIT-D816V induces STAT tyrosine phosphorylation.* STAT protein phosphorylation in parental and KIT-D816V stably transfected TF-1 and MO7e cells were investigated as in (A). Membranes were also probed with anti-ERK2 as a loading control.

(D) *Kinetics of STAT1, STAT3, STAT5, AKT and ERK activation in BMMCs following SCF stimulation.* Starved BMMCs were stimulated with 250ng/mL of SCF for the indicated time. Soluble Cell Lysates (SCLs) were analysed by western-blotting (60 $\mu$ g of proteins per lane). KIT, STAT1, STAT3, STAT5, AKT and ERK activation were assessed using specific phospho-antibody and each membrane was then stripped and reprobed with their respective antibodies. The last lane was loaded with a lysate of BMMCs obtained from KIT-D816V transgenic mice (BMMC16M).

### Fig. 2. Contribution of JAK and SFK to KIT-D816V mediated STATs tyrosine phosphorylation.

*The activation of STATs is JAK independent in P815 cells but JAK dependent in HMC-1.* Starved P815 (A) and HMC-1 cells (B) were treated for 2 hours with the indicated concentration ( $\mu$ M) of JAK Inhibitor I. SCLs were subjected to JAK3 immunoprecipitation. The membrane was analysed with anti-PY-antibody (4G10), striped and reprobed with anti-JAK3 antibody (upper panels). The effect of the JAK Inhibitor I treatment on STATs activation (lower panels) in P815 cells and HMC-1 cells was analysed with specific anti-phosphotyrosine STAT antibodies as indicated.

(C) *SFK contribution to STATs tyrosine phosphorylation.* P815 and HMC-1 cells were treated with SU6656 for 2 hours. 50  $\mu$ g of proteins from cell lysates were probed with activation-specific phospho-KIT (Y719), phospho-STAT1 (Y701), phospho-STAT3 (Y705), phospho-STAT5 (Y694), phospho-LYN (Y396). Anti-Tubulin was used as control.

### Fig.3. KIT-D816V is a STAT tyrosine kinase in vitro.

(A) *Enzymes titration.* Kinase titration assays were done with enzyme quantity ranging from 0 to 3  $\mu$ g/assay for KIT-D816V (upper panel) and SRC (lower panel), in excess of GST-STATs substrates and

ATP. The enzymatic reaction time was 1 hour. Substrate phosphorylation was revealed using phosphotyrosine STAT specific antibodies by ELISA. Each curve represents the difference between specific versus background signal for each antibody (OD of the GST-STAT minus OD of GST-alone). The graphs show one representative experiment out of three. Each measure was done in duplicate with indicated standard deviation.

(B) *Specificity of the assay.* The specificity of the kinase assay was assessed using a mutated STAT5 GST-construct (GST-STAT5-Y694F) both in ELISA and western-blotting.

(C) *K<sub>M</sub> substrate evaluation.* Kinase reactions were performed for one hour with 1 µg of enzyme, 250µM of ATP and increasing concentrations of GST-substrates. Data are from one representative experiment out of three. Each measure was done in duplicate with indicated standard deviation.

Fig. 4. Interaction between KIT-D816V and STATs in HMC-1 cells.

(A) *Co-immunoprecipitation of endogenous proteins in HMC-1 cells.* HMC-1 cells were starved overnight and subsequently treated or not for 2 hours with Dasatinib. SCLs were subjected to immunoprecipitation with anti-KIT antibody. Proteins from immunocomplexes were resolved by SDS-PAGE and probed with anti-STAT antibodies (left panel) or with anti-activated SFK antibodies (Y937-LYN and Y416-SRC) (right panel).

(B) *Peptide pull-down assays.* HMC-1 SCL was used for affinity pull-down assay with 2 nmol of either non phosphorylated peptide (Y568Y570), or mono-phosphorylated peptides (pY568 and pY570) or bi-phosphorylated peptide (pY568pY570). The binding of STAT1, STAT3 and STAT5 was revealed with specific antibodies. SCL was used as positive control.

Fig. 5. KIT-D816V triggers STAT5 transcriptional activity.

(A) *STATs reporter assays in COS cells.* COS-7 cells were transfected with three different STAT firefly luciferase (F-luc) reporter vectors and a control renilla luciferase (R-luc) vector. STAT1 activation was monitored using pGAS-luc, a commercial vector containing a STAT1 homodimer binding GAS-like sequence. STAT3 activation was monitored with p4xTSVluc containing the core region of the LIF-response element of the rat a2M gene and pβCasein-luc plasmids were used to monitor STAT5 activity.

The activity of the reporter plasmids was compared between COS cells transfected either with WT KIT or KIT-D816V expression vectors. The Luciferase activity was measured 48 hours after transfection as described in Materials and Methods. COS cells expressing unstimulated WT KIT were used as control and their activity was normalized to 1. Data represent an average of five independent experiments (each done in triplicate) with indicated standard deviation.

(B)(C) *STAT reporter assays in mastocytoma cell lines.* P815 cells (B) and HMC-1 cells (C) were electroporated with each STAT activity reporter plasmid and renilla plasmid control. Cells were grown for 6 hours in presence or absence of Dasatinib before lysis. Left panel shows a representative experiment out of three independent experiments done in triplicate. The data shown in the right panel represents an average of 3 independent experiments (each done in triplicate) with indicated standard deviation for STAT5 activity. Statistically significant differences relative to untreated cells are indicated (Man Whitney, \*\*\*P<0,0001).

Fig. 6. KIT-D816V-mediated STATs serine phosphorylation and nuclear localization.

(A) *KIT-D816V-mediated serine phosphorylation of STAT3 and STAT5.* P815 and HMC-1 cells were starved overnight and subsequently treated or not with Dasatinib. SCLs were subjected to immunoprecipitation with anti-STAT antibodies. Immunocomplexes were resolved by SDS-PAGE and probed with anti-phospho-serine specific antibody, stripped and reprobed with anti-STAT as indicated.

(B) *ERK pathway is implicated in STAT3 serine phosphorylation.* STATs serine phosphorylation was analysed as described in (A) after treatment of cells with MEK inhibitor U0126.

(C) *PKC pathway is implicated in STAT5 serine phosphorylation.* STATs serine phosphorylation was analysed as described in (A) after treatment of cells with PKC inhibitor Bisindolylmaleimide.

Similar results were obtained in three independent experiments for each western blot presented.

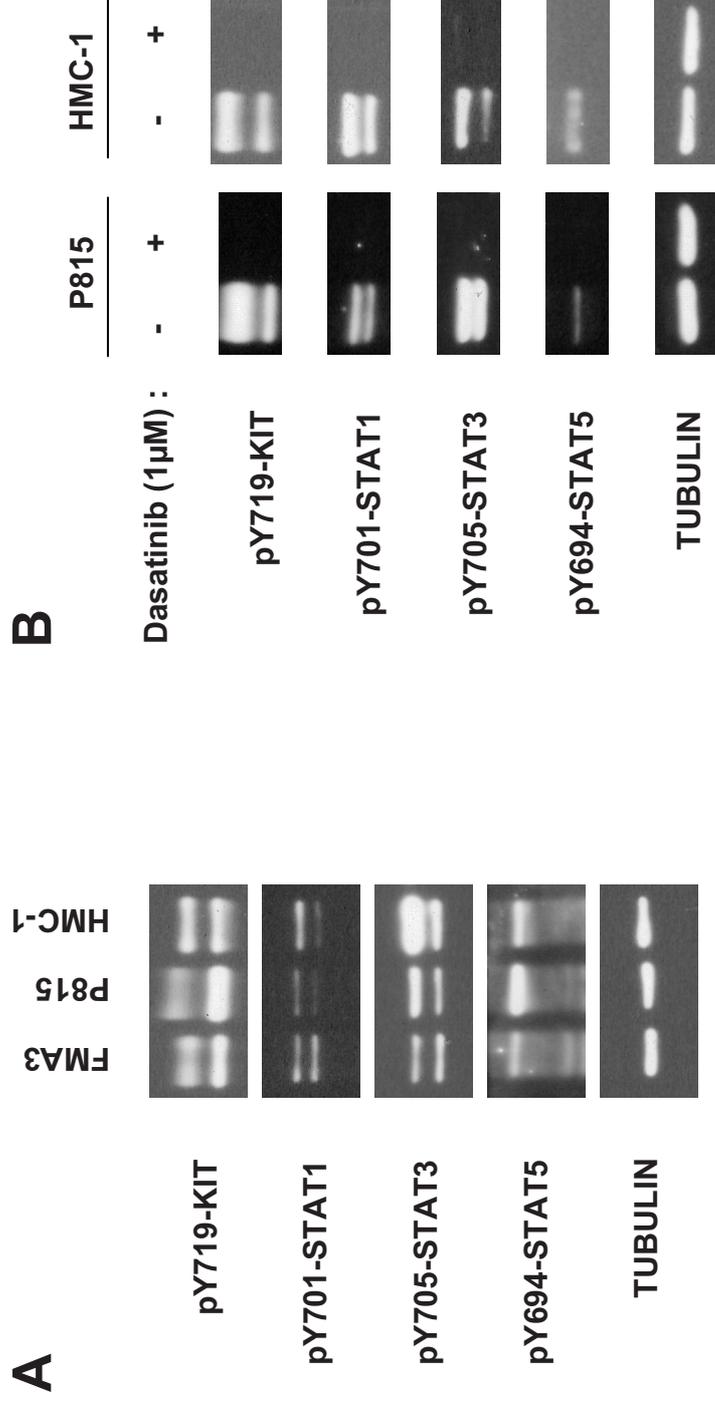
(D) *Cytoplasmic and nuclear localization of STATs.* HMC-1 cells were starved overnight and subsequently treated or not with Dasatinib. Cytoplasmic fraction (CYTO) was obtained after lysis in hypotonic buffer. Nuclear fraction (NUC) was obtained from hypertonic shock of pelleted nuclei. Lysates were loaded as cell number equivalents (i.e. cytoplasmic and nuclear fractions obtained from  $5 \cdot 10^5$  cells). STAT1, STAT3 and STAT5 location was analysed by western-blotting both with phosphotyrosine specific antibodies and antibodies directed against total proteins.

Supplemental Fig. 1. Effect of JAK3 siRNA on STAT phosphorylation.

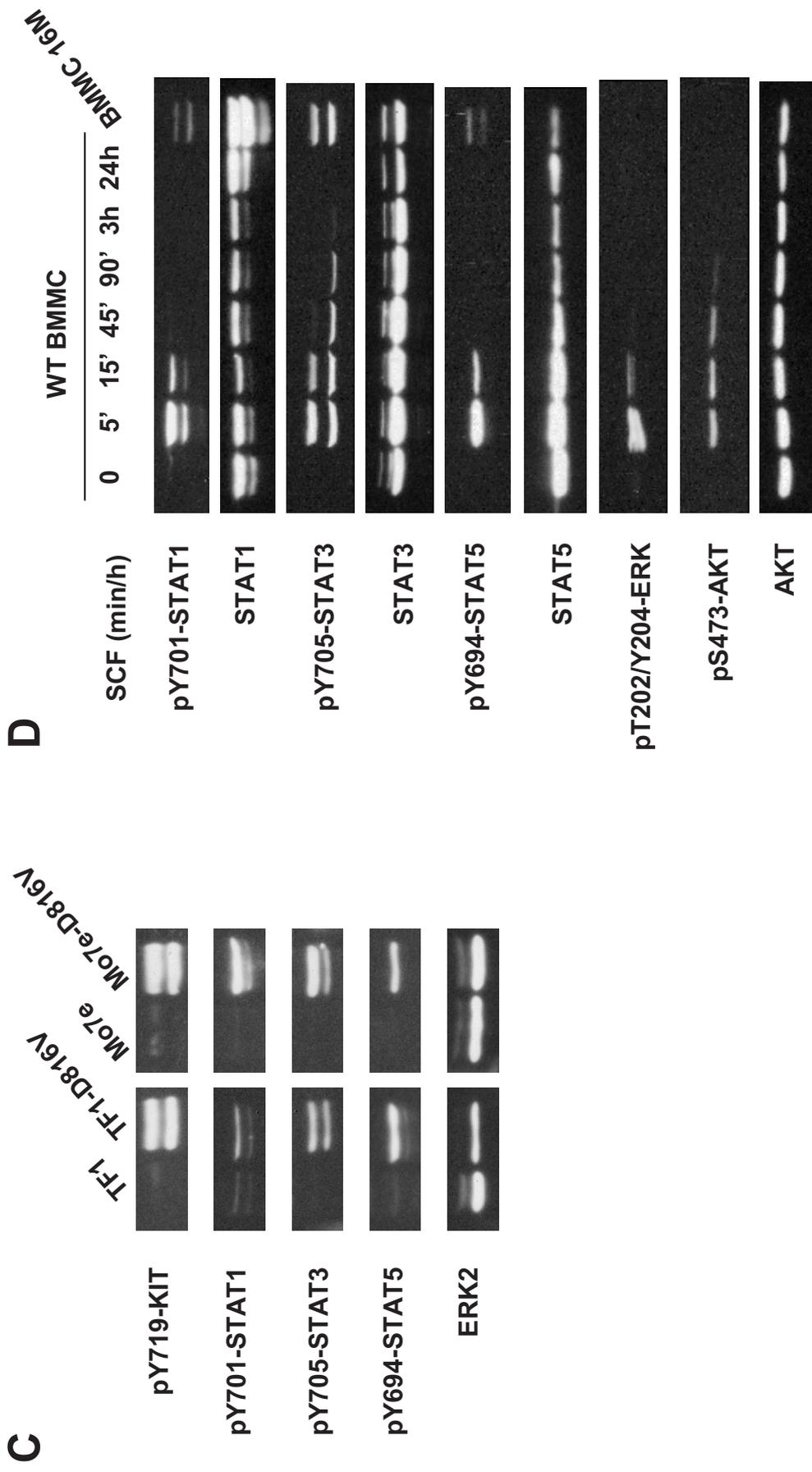
P815 cells treated either with control or JAK3 siRNA were starved and lysed. The SCLs were immunoblotted with phospho-STAT specific antibodies as indicated and anti-ERK as loading control.

Supplemental Fig. 2. GSK3, p38, PKA, PKG, and CAMKII are not implicated in STAT1, -3, -5 serine phosphorylation.

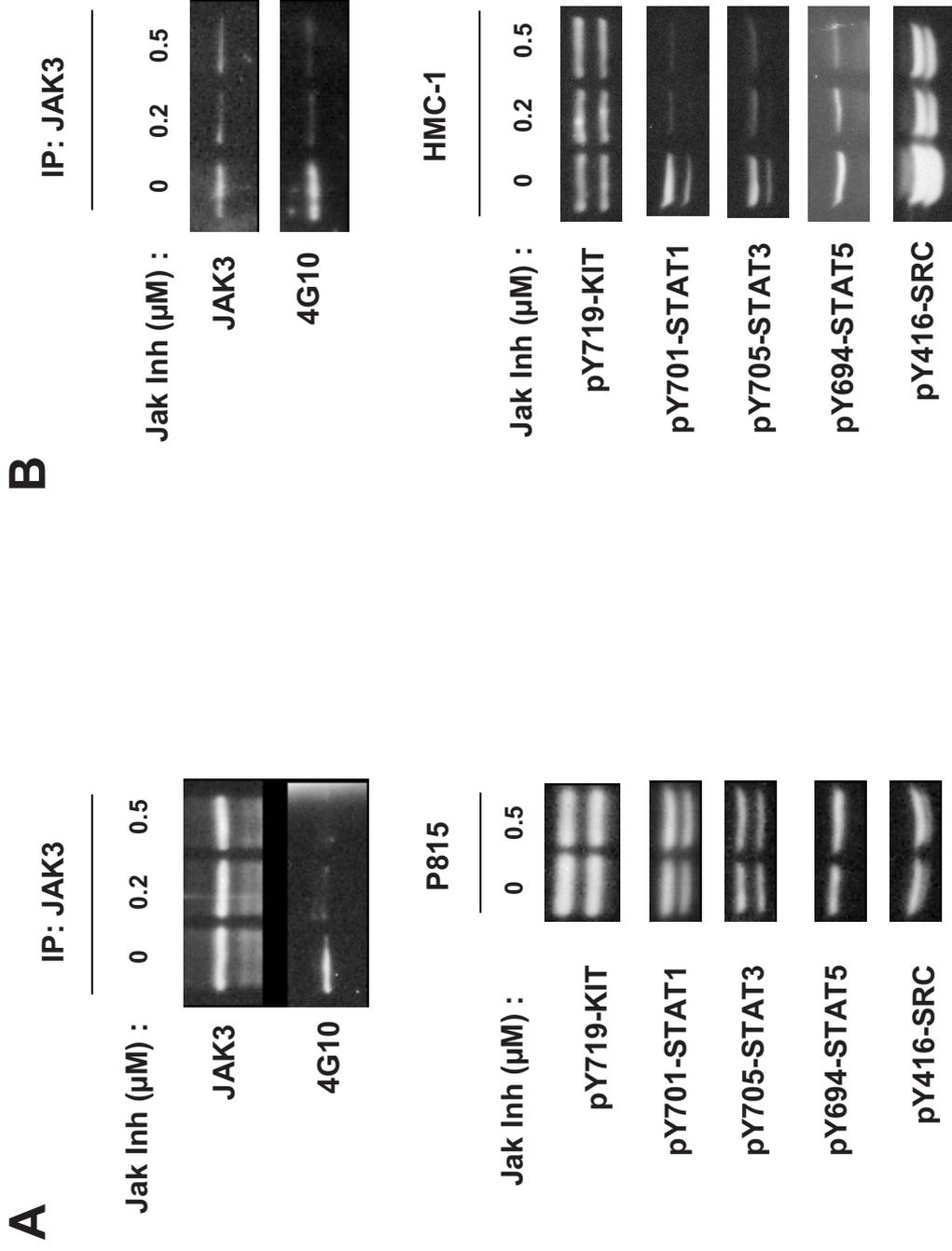
P815 and HMC-1 cells were starved overnight and subsequently treated with the indicated chemical inhibitors. The SCLs were immunoprecipitated using anti-STAT specific antibodies. Immunocomplexes were resolved by SDS-PAGE and probed with anti-phosphoserine specific antibodies, stripped and reprobed with the corresponding anti-STAT antibodies. SB203580 is a p38 inhibitor, KN-93 a CAMKII inhibitor, H-89 is a PKA inhibitor, PKG inhibitor is a PKG inhibitor and SB216763 is a GSK3 inhibitor.



**FIGURE 1**

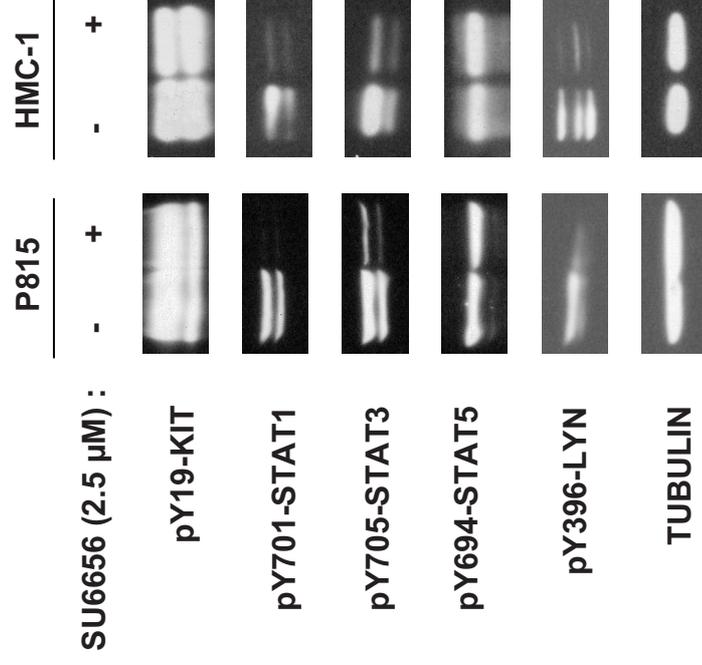


**FIGURE 1**

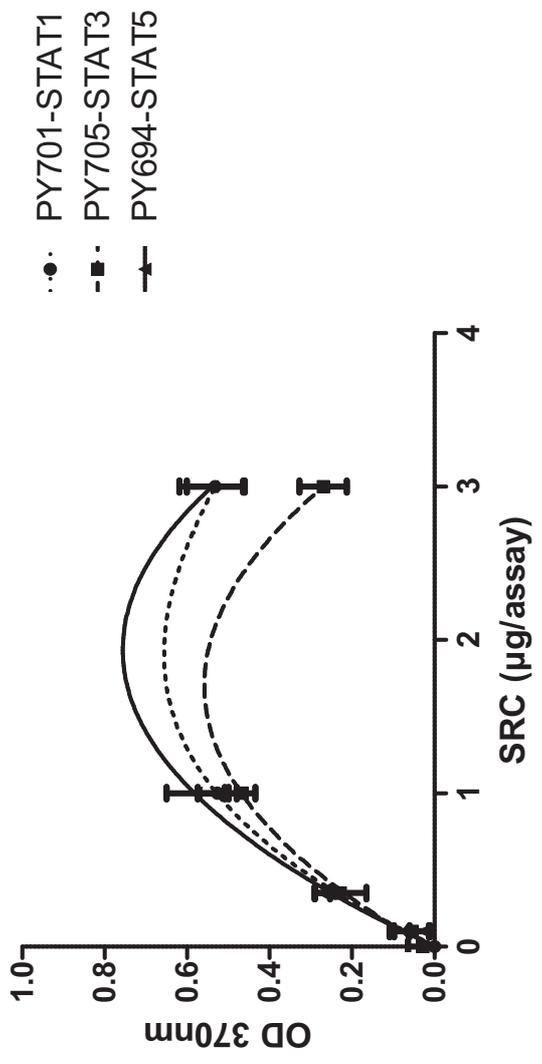
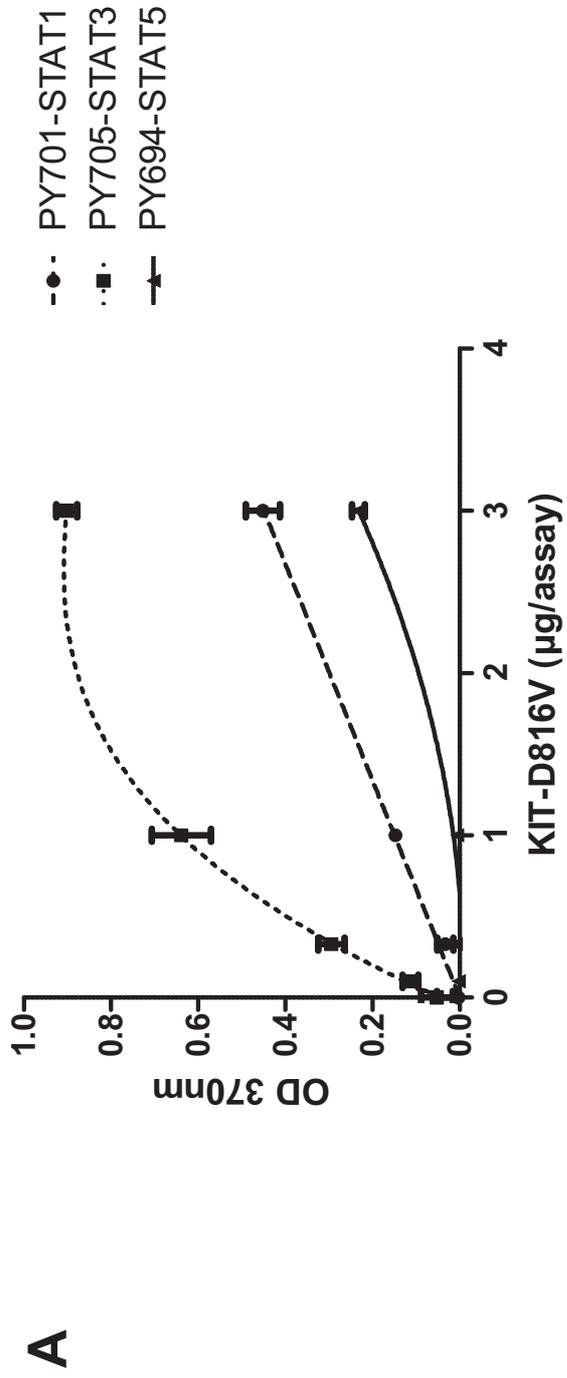


**FIGURE 2**

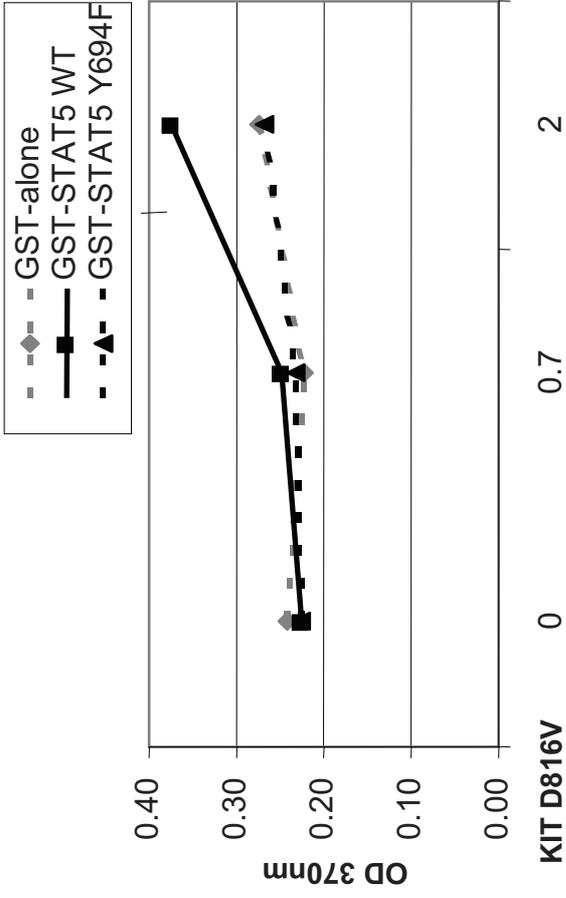
**C**



**FIGURE 2**



**FIGURE 3**

**B**KIT D816V ( $\mu$ L)

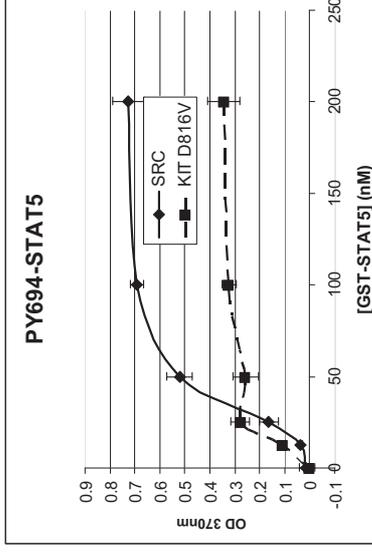
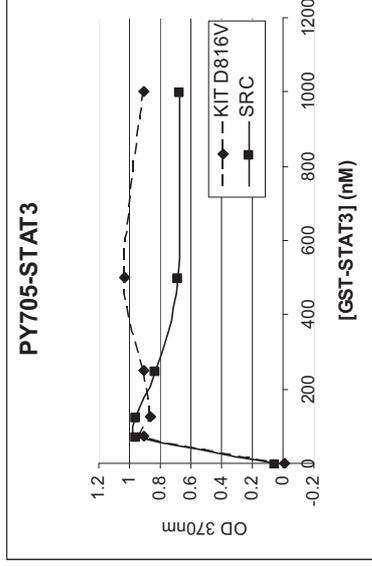
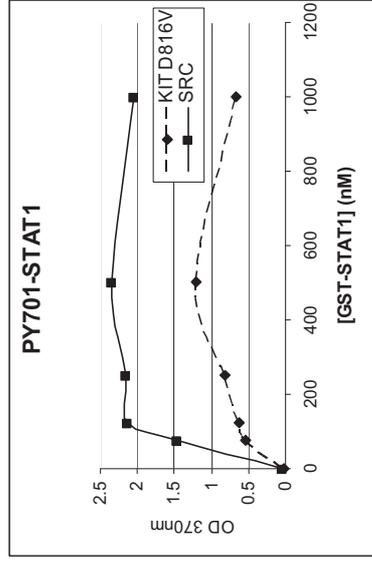
0 0.7 2 6

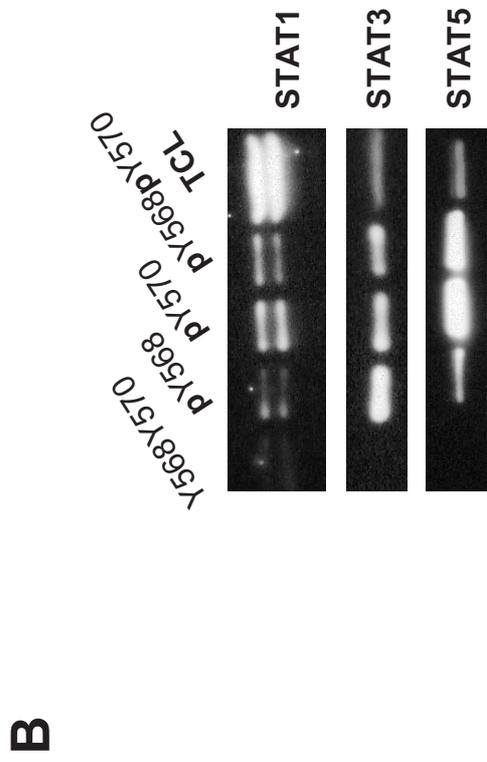
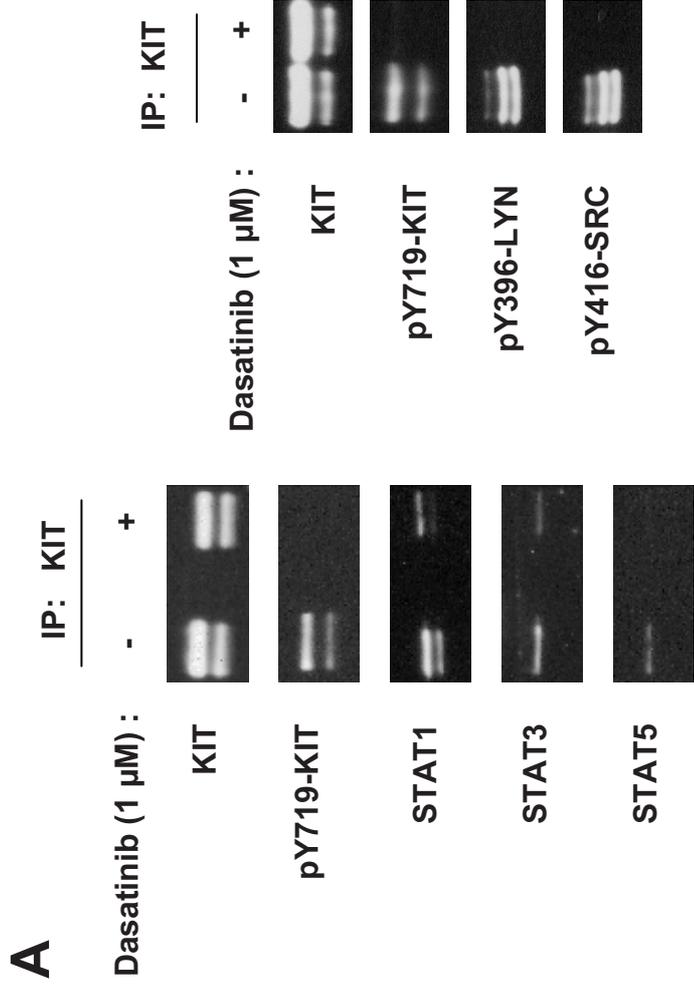


0 0.7 2 6

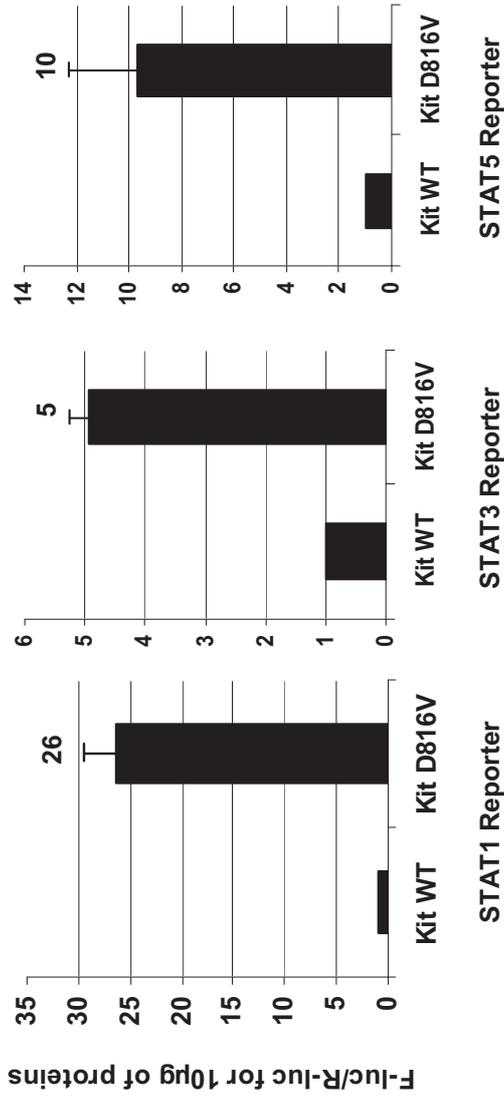


WB: pY694-STAT5

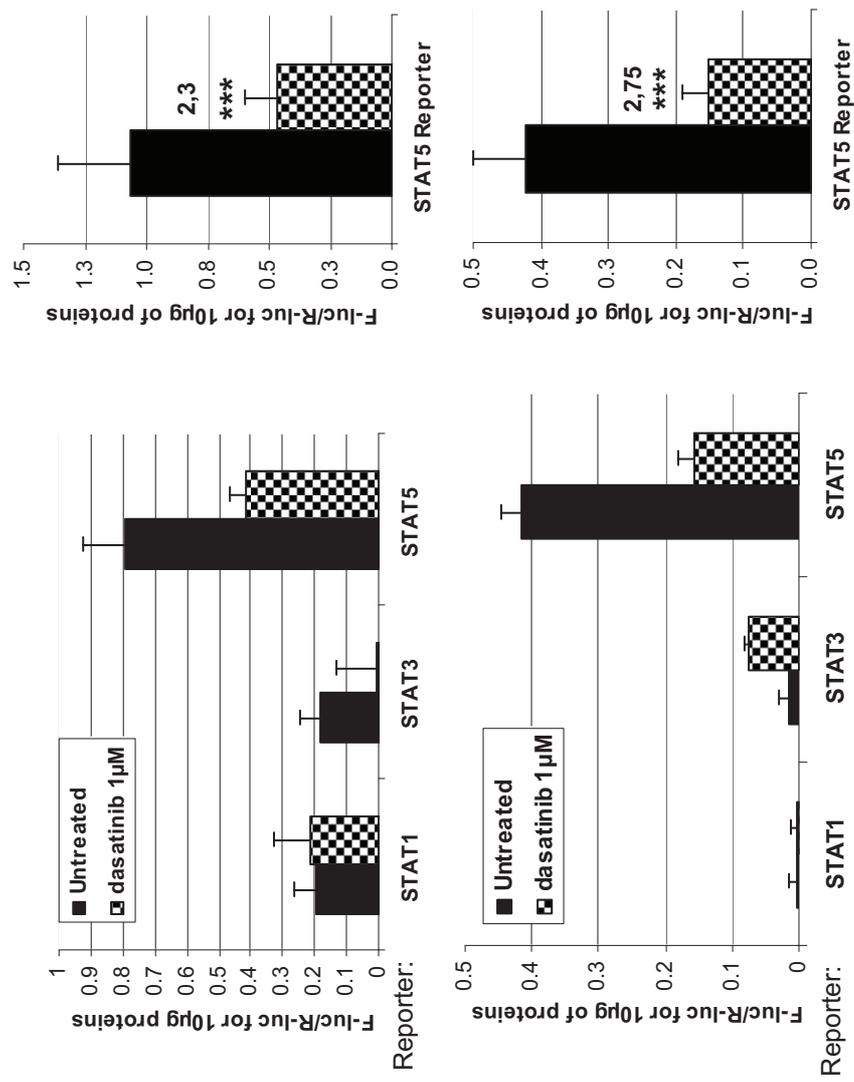
**C****FIGURE 3**



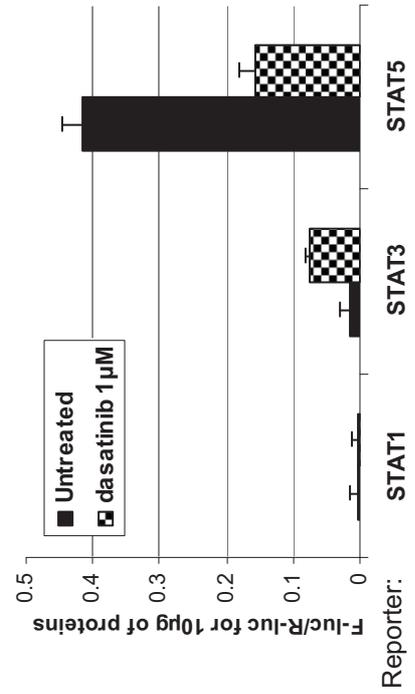
**FIGURE 4**



**A**

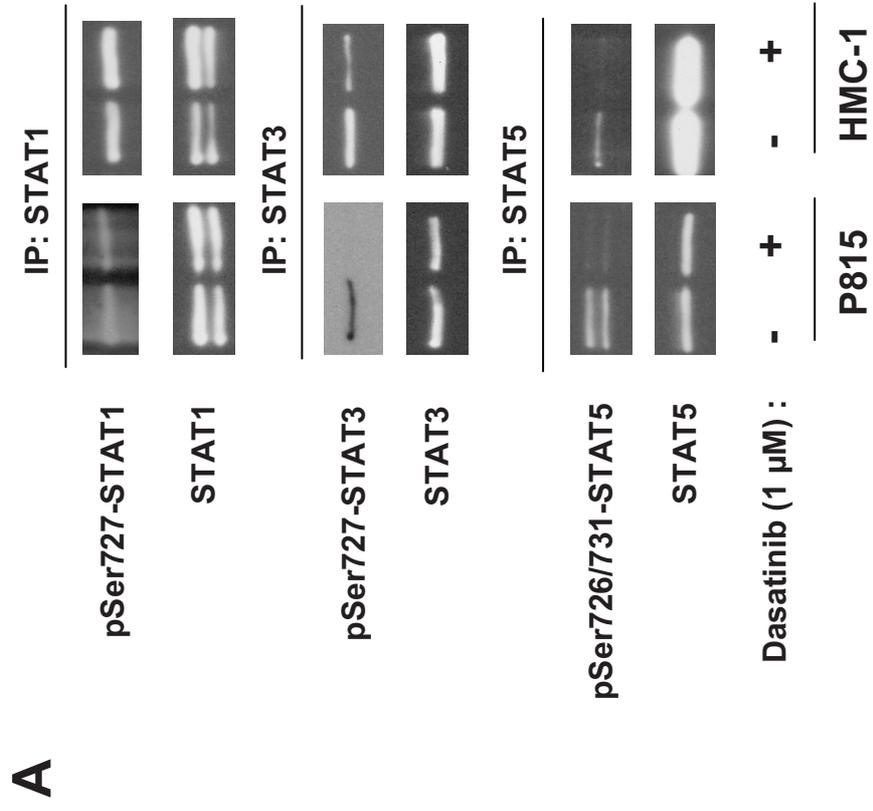


**B**



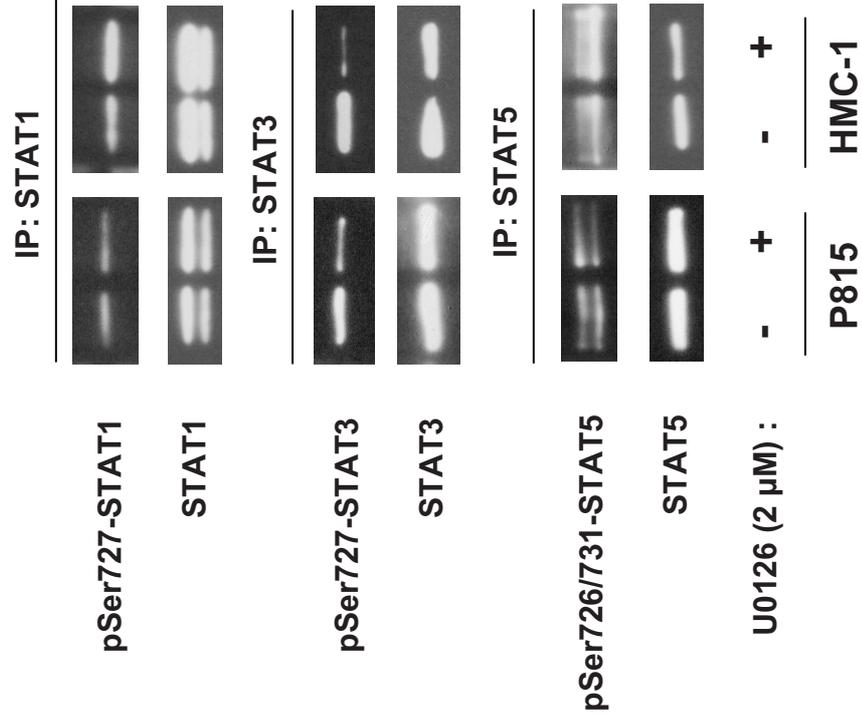
**C**

**FIGURE 5**

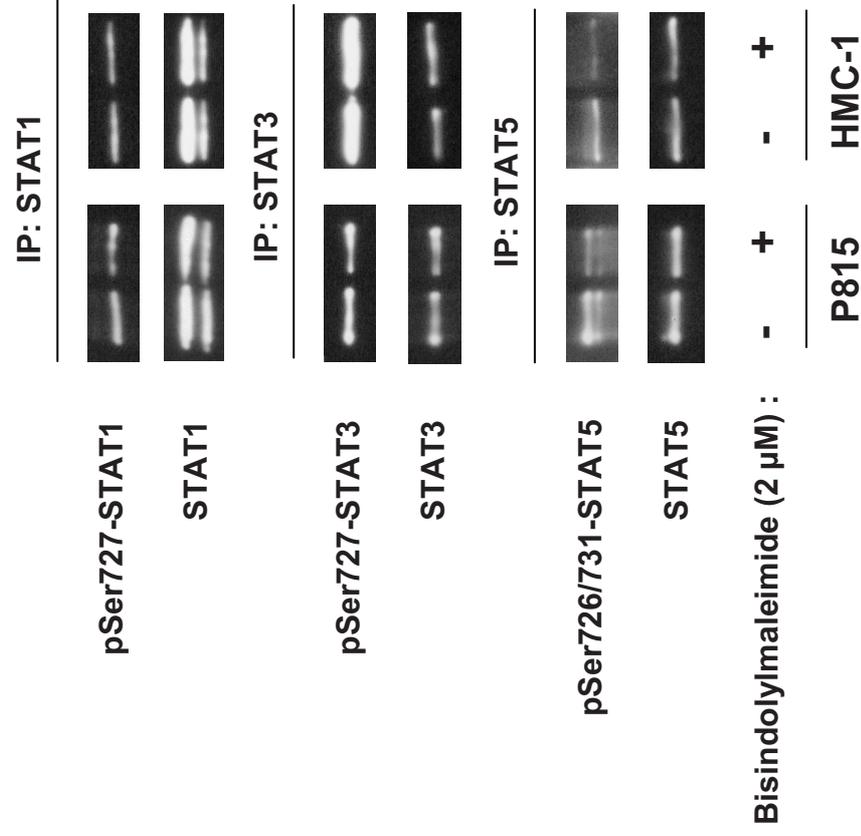


**FIGURE 6**

**B**

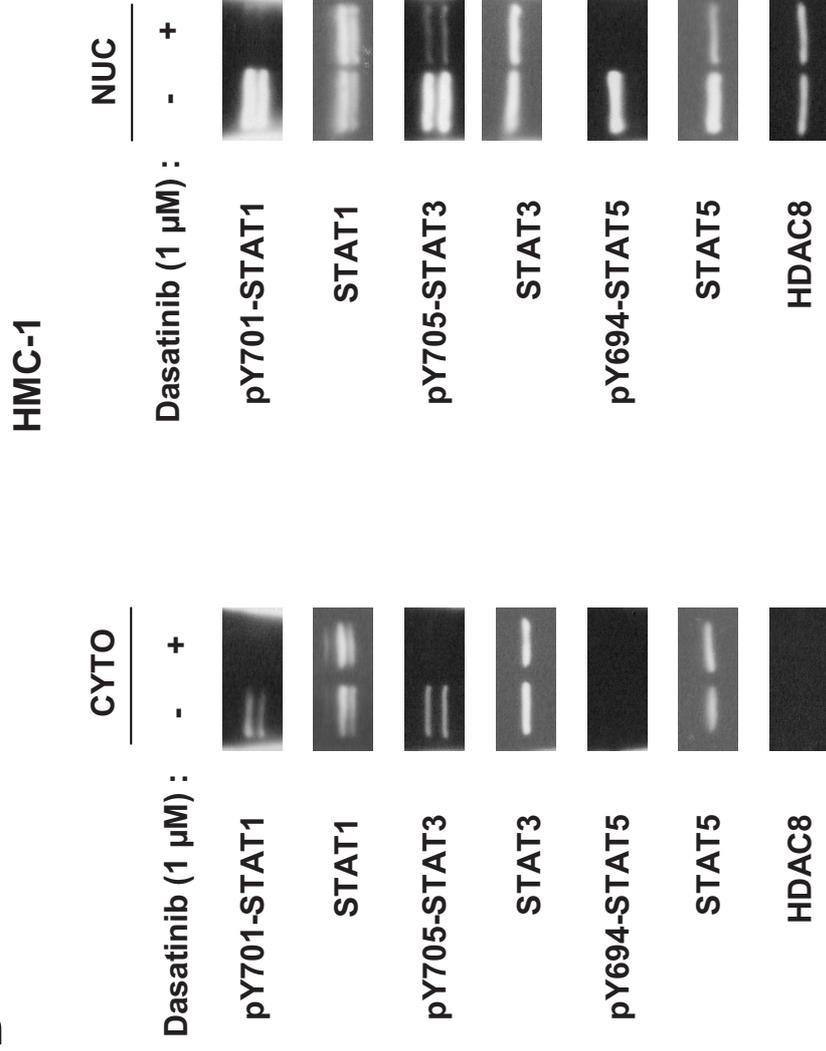


**C**



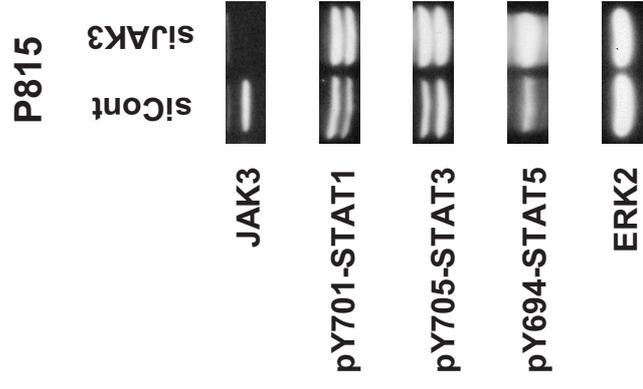
**FIGURE 6**

**D**



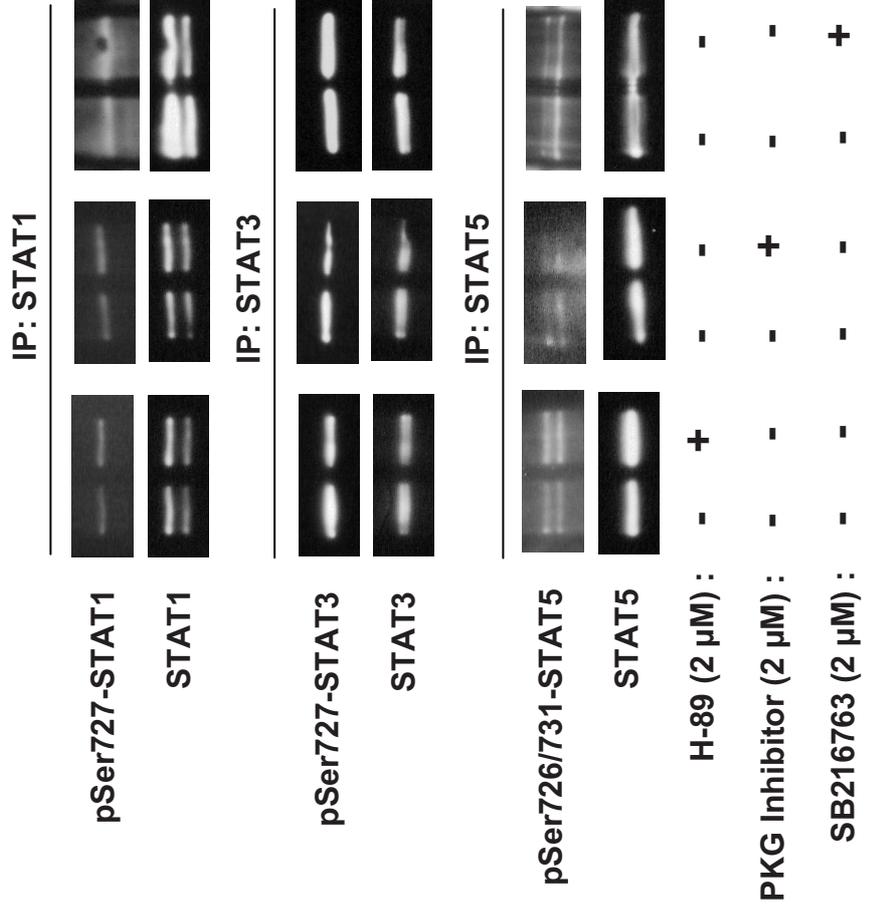
**FIGURE 6**

# Supplemental Figure 1



# Supplemental Figure 2

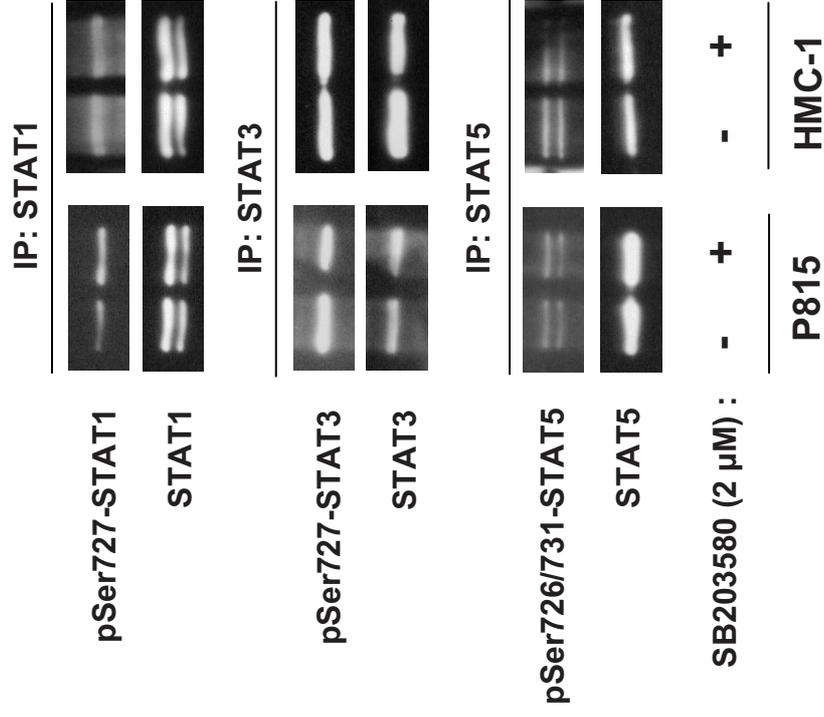
**A**



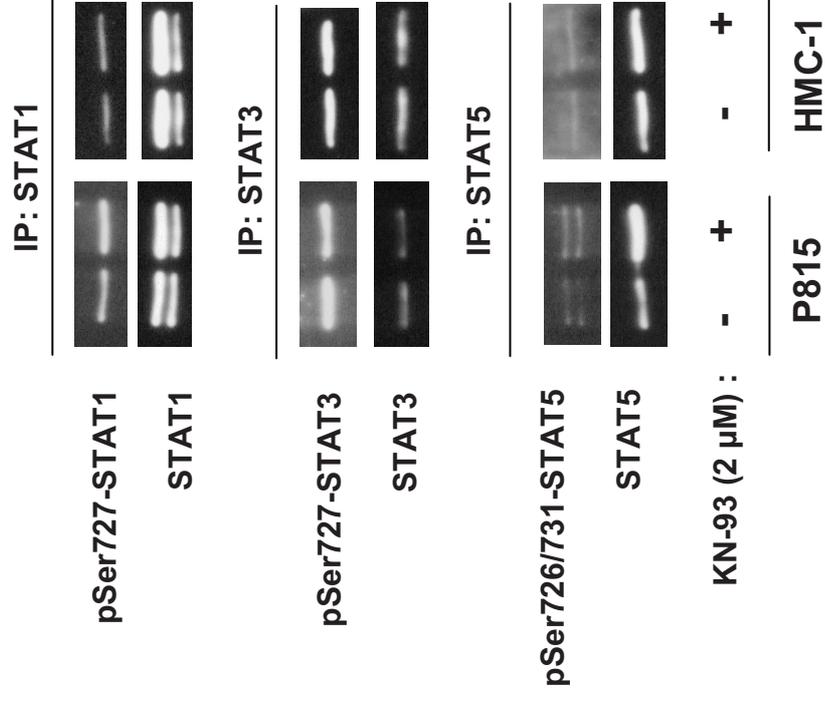
P815

# Supplemental Figure 2

**B**



**C**



## **Partie 2 : Fonction des tyrosines Y568 et Y570 dans la transformation cellulaire dépendante de KIT<sup>D816V</sup>.**

L'article scientifique présentant les résultats de cette étude est en cours de préparation. Le travail est présenté en français, à l'exception de la partie « matériel et méthodes » et des légendes des figures qui sont rédigées en anglais.

### **2-A- Introduction**

#### **2-A-1- Le motif dityrosine du domaine juxtamembranaire des RTK de classe III**

Tous les RTK de classe III sauf FMS présentent dans leur domaine juxtamembranaire intracellulaire un motif dityrosine particulier.

hKIT : 561-EEINGNNYVYIDPTQLPYDH-580

hPDGFR $\alpha$  : 565-ISP DGHEIYIVDPMQLPYDS -584

hPDGFR $\beta$  : 572-VSSDGHEIYIVDPMQLPYDS -591

hFLT3 : 582-TGSSDNEYFYVDFREYDYDL-601

hFMS : 554-ESYEGNSYTFIDPTQLPYNE-573

Les **domaines SH2** sont capables d'interagir avec une tyrosine phosphorylée dans un contexte d'acides aminés C-terminal. Le site de liaison est bipartite, avec une poche contenant une arginine conservée responsable de la liaison avec la tyrosine phosphorylée et une seconde poche plus variable qui reconnaît spécifiquement les acides aminés immédiatement après la tyrosine (de 3 à 6).

Ce **motif dityrosine** constitue un **motif très particulier** dans la mesure où dans le cas de la première tyrosine, la séquence C-ter dont dépend la spécificité de reconnaissance contient la deuxième tyrosine qui est potentiellement phosphorylée créant un encombrement stérique et une charge importante. Par ailleurs on peut envisager que ce site existe dans **quatre états distincts** que sont (i) une absence de

phosphorylation, (ii) et (iii) les phosphorylations uniques de l'une ou l'autre des tyrosines et finalement (iv) un état biphosphorylé.

## **2-A-2- Le motif dityrosine juxtamembranaire de KIT**

### **YY568-570 pour hKIT, YY567-569 pour mKIT**

#### **2-A-2-1- Considérations biochimiques**

Comme nous l'avons décrit précédemment, le domaine juxtamembranaire intracellulaire de KIT fonctionne comme un inhibiteur conformationnel de l'activité kinase du récepteur. Suite à la liaison du SCF sur le récepteur, la dimérisation des récepteurs induit une première phase au cours de laquelle deux tyrosines du domaine JM sont phosphorylées. Cette phosphorylation déstabilise la structure du domaine JM conduisant à la libération de la fente catalytique de la kinase et à l'acquisition d'une conformation pleinement active <sup>104</sup>.

Ces tyrosines qui sont les premières à être phosphorylées <sup>105</sup> sont localisées en position 568 et 570 du récepteur KIT humain. Des données structurales suggèrent par ailleurs que ces tyrosines phosphorylées sont exposées vers le cytoplasme et accessibles pour l'interaction avec des partenaires protéiques capables d'interagir via leurs domaines SH2.

#### **2-A-2-2- Les interacteurs connus du motif dityrosine**

De nombreux interacteurs sont décrits comme pouvant interagir avec l'une ou l'autre des tyrosines suite à l'activation du récepteur KIT sauvage. Ces résultats expérimentaux proviennent d'analyses dans de nombreux modèles cellulaires différents et donnent parfois des résultats contradictoires.

On peut citer comme partenaires les protéines adaptatrices **APS** <sup>136</sup>, **LNK** <sup>485</sup> et **SHC** <sup>163</sup>, les kinases **CHK** <sup>163</sup> et **LYN** <sup>172 173</sup>, l'E3-ubiquitine ligase **Cbl** <sup>229</sup>, les tyrosine phosphatases **SHP1** <sup>207 206</sup> et **SHP2** <sup>207</sup>.

L'ensemble des données bibliographiques sur ce point sont rassemblées dans les [tableaux 5 et 6](#). Le tableau 5 présente les interacteurs et leur structure, tandis que le tableau 6 précise le type d'expériences appuyant la démonstration de l'interaction ainsi que, le cas échéant, les conclusions issues de l'analyse des conséquences fonctionnelles de la mutation du site au niveau cellulaire.

Tableau 5 : Les interacteurs connus du site dityrosine juxtamembranaire de KIT et leur organisation structurale schématique.

	SITE	Schéma structural
<b>APS</b>	hKIT pY568 (I571) pY936 (L939)	
<b>LNK</b>	mKIT pY567 ppY567-569	
<b>CBL</b>	hKIT pY568 (I571) pY936 (L939)	
<b>CHK</b>	hKIT ppYY568-570 pY721	
<b>LYN</b>	hKIT pY568 ppYY568-570	
<b>FYN</b>	mKIT pY567 ppYY567-569	
<b>SHC</b>	hKIT pY568 ppYY568-570	
<b>SHP1</b>	mKIT pY569 ppY567-569	
<b>SHP2</b>	mKIT pY567 ppY567-569	

Tableau 6 : Caractérisation expérimentale des interacteurs du site dityrosine Y568-570 juxtamembranaire de KIT.

## Fonction du motif dityrosine Y568-570 dans l'oncogénèse KIT-dépendante

	Peptides Pull Down		GST Pull Down	Co-immunoprécipitation		REFERENCE
	CELLULES	INFO COMPLEMENTAIRES		CELLULES	DETAILS	
<b>APS</b>	COS-7 tf APS	Pep PD + pY568-A571 ou pY936-A939 compétiteurs -> APS perdue I/L requit en +3	COS-7 tf KIT COS-7 tf KIT-4571A-L939A	Co-IP APS-KIT (vue en 4G10) Co-IP APS-KIT perdue		Wolberg and Ronnstrand, 2003, Biochem J
<b>LNK</b>	BMMC Protéines endogènes	Ba/F3 tf KIT: GST-SH2-LNK -> KIT transfecté Ba/F3 tf KIT-Y567F: GST-SH2-LNK -> KIT perdue	BMMC tf LNK	Co-IP LNK-KIT		Simon and Velazquez, 2008, Blood
<b>CBL</b>	Système acellulaire Pep PD avec GST-Cbl	+ pep compétiteurs I/L requit en +3	COS-1 tf KIT COS-1 tf KIT-4571A-L939A	Co-IP Cbl-KIT Co-IP Cbl-KIT perdue	<b>COS-1 tf KIT-Y568-570F</b> P-Cbl perdue activité kinase des SFK perdue <b>PAE tf KIT-Y568-570F</b> Ub perdue Internalisation suite au SCF réduite <b>Ba/F3 tf KIT-Y568-570F</b> Internalisation du récepteur réduite	Masson and Ronnstrand, 2006, Biochem J
<b>CHK</b>	Mo7e Protéines endogènes	Mo7e : GST-SH2-CHK > -KIT endogène COS-7 tf KIT: GST-SH2-CHK > KIT transfecté COS-7 tf KIT-Y568F: GST-SH2-CHK > KIT perdue	Mo7e Protéines endogènes			Price and Avraham, 1997, JBC
<b>LYN</b>		Mo7e: GST-KIT-JM -> LYN endogène	Mo7e Protéines endogènes	Co-IP LYN-KIT Indpte de activation de LYN	<b>Mo7e + oligonucléotides antisens lyn</b> prolifération réduite	Linnekin and Mou, 1997, JBC
<b>FYN</b>		PAE tf KIT: GST-SH2-SRC + pep pY568 et ppY568-570 -> KIT perdue PAE tf KIT: GST-SH2-SRC -> KIT 32D tf KIT: GST-SH2-FYN -> KIT 32D tf KIT-Y567F: GST-SH2-FYN -> KIT perdue 32D tf KIT-Y567-569: GST-SH2-FYN -> KIT perdue	PAE tf KIT	<b>Co-IP SFK-KIT negative</b>	<b>PAE tf KIT-Y568-570F</b> <b>P-SHC perdue</b> Activation ERK perdue Induction c-fos réduite prolifération réduite	Lenmarston and Ronnstrand, 1999, Oncogene
<b>SHC</b>	Mo7e Protéines endogènes	Mo7e: GST-SH2-SHP1 -> KIT endogène HEL: GST-SHP1 -> KIT endogène EL4: GST-KIT-JM -> SHP1 endogène EL4: GST-KIT-ΔY569 -> SHP1 perdue EL4: GST-KIT-JM + pep ppY567-569 -> SHP1 perdue EL4: GST-KIT-JM -> SHP2 endogène EL4: GST-KIT-Y567F -> SHP2 perdue EL4: GST-KIT-4570A -> SHP2 perdue I/L requit en +3	Mo7e Protéines endogènes	Co-IP SHP1-KIT SCF dépendante		Price and Avraham, 1997, JBC
<b>SHP1</b>			Mo7e Protéines endogènes	Co-IP SHP1-KIT SCF dépendante		Yi and Ihle, 1996, MCB
<b>SHP2</b>			Mo7e Protéines endogènes	Co-IP KIT-SHP1 SCF dépendante + P-SHP1 Co-IP KIT-SHP-1 perdue	<b>Ba/F3 tf KIT-Y568F</b> prolifération augmentée	Kozlowski and Siminovich, 1998, MCB
			Ba/F3 tf KIT Ba/F3 tf KIT-Y567F	Co-IP KIT-SHP-2 Co-IP KIT-SHP-2 perdue	<b>Ba/F3 tf KIT-Y567F</b> prolifération augmentée	Kozlowski and Siminovich, 1998, MCB

## 2-A-2-3- Les fonctions connues du motif dityrosine dans le contexte du récepteur KIT sauvage

Le rôle fonctionnel de la plateforme de signalisation Y568-Y570 a été étudié *in vitro* par l'analyse de cellules exprimant différents récepteurs mutants de KIT sur le site dityrosine. Le rôle fonctionnel du site a aussi été révélé *in vivo* dans des modèles de souris transgéniques knocked-in. Les résultats de ces études sont détaillés dans la suite de ce paragraphe.

### a- Etude des souris transgéniques knocked-in

Deux équipes ont réalisé des animaux transgéniques knocked-in au niveau du site Y567-Y569. L'équipe de Besmer a généré la souris  $mKit^{567F/146}$  et l'équipe de Bernstein, les souris  $mKit^{567F}$ ,  $mKit^{569F}$  et  $mKit^{567-569FF}$  (notée  $Kit^{FF}$ )<sup>145</sup>. Les résultats issus de l'analyse de ces souris sont présentés ici.

#### a1- Les souris de l'équipe de Bernstein<sup>145</sup>

		Viabilité des animaux
Homozygotes	$Kit^{567F}$	viables
	$Kit^{569F}$	30% de mortalité néo-natale
	$Kit^{FF}$	médiane de survie 3-4 semaines
Hétérozygotes	$Kit^{567F}$	viables
	$Kit^{569F}$	10% de mortalité néo-natale
	$Kit^{567F}/Kit^{569F}$	viables
	$Kit^{FF}$	Non renseignée

Les souris  $mKit^{567F}$  sont viables à l'état hétérozygote ou homozygote. A l'inverse les souris  $mKit^{569F}$  présentent un défaut de vieillissement qui s'accroît entre l'état hétérozygote et l'état homozygote. Les souris homozygotes  $Kit^{FF}$  meurent rapidement après la naissance.

Les auteurs ont ensuite analysés spécifiquement les **compartiments physiologiquement dépendants de la voie SCF/KIT pour leur développement.**

### **Compartiment mélanocytaire**

Le phénotype *white spotting* est présent à différents degrés chez tous les mutants. La surface de peau dépigmentée augmente quasi linéairement entre les simples mutants hétérozygotes et homozygotes. Le double mutant hétérozygote a une dépigmentation faible, tandis que 90% du pelage de l'homozygote est dépigmenté.

### **Compartiment mastocytaire**

Les simples mutants homozygotes ont un nombre réduit de mastocytes tandis que le double mutant n'en a quasiment pas. Cependant toutes ces souris ont un nombre identique normal de CFU-mast.

Ainsi il semble exister une coopération entre les deux tyrosines du site pour la génération d'un **signal essentiel à la migration et/ou la prolifération des mélanocytes et des mastocytes**. De manière intéressante, le phénotype dans le compartiment mastocytaire est très similaire à celui observé dans les souris *gab2* <sup>-/-</sup> <sub>165</sub>.

### **Autres compartiments**

L'analyse de l'hématocrite des souris, de l'architecture et de la fonctionnalité du réseau d'ICC, ainsi que de la fertilité n'ont révélé aucun défaut. Le site ne semble pas jouer de rôle fondamental dans le développement et la fonction de ces compartiments. Il est intéressant de comparer ce résultat au défaut majeur de fertilité des souris KI knocked-in *mKit*<sup>719F 132 144</sup>.

### **Défauts additionnels**

Les souris *Kit*<sup>FF/FF</sup> présentent une hypertrophie de l'estomac et du haut intestin non expliquée ainsi qu'une splénomégalie liée à l'augmentation du nombre de mégacaryocytes et de lymphocytes pré-B. De manière intéressante, ce phénotype dans le compartiment B est très similaire à celui observé dans les souris *Ink* <sup>-/-</sup> <sub>486</sub>.

### **Études moléculaires**

En terme de signalisation, l'introduction des mutants dans des cellules 293T révèle une différence d'activation de la voie ERK qui est diminuée dans le mutant KIT-Y569F et totalement abolie dans le mutant KIT-FF <sup>145</sup>.

## **a2- Les souris de l'équipe de Besmer** <sup>146</sup>

L'analyse de ces souris a conduit à des résultats identiques. Les souris homozygotes *Kit*<sup>567F</sup> sont fertiles, présentent une légère dépigmentation, et ont un nombre réduit de mastocytes dans le péritoine. Dans les BMMC issus des animaux *Kit*<sup>567F</sup>, l'interaction de KIT avec LYN est perdue. Ces souris n'ont pas de défauts hématopoïétiques et possèdent un hémocrite normal à l'équilibre. Une étude ultérieure a révélé qu'elles ont un défaut majeur dans la capacité à reconstituer le compartiment érythropoïétique après un stress <sup>487</sup>.

## **b- Etude *in vitro* de mutants « add-back » F->Y**

L'avantage des expériences de add-back est de pouvoir étudier les contributions biochimiques et fonctionnelles individuelles de différentes tyrosines en évitant les compensations pouvant conduire à une sous-estimation de l'implication d'une voie.

L'équipe de Kapur a construit un récepteur KIT « nu » qui contient des substitutions en phénylalanine de sept tyrosines intracellulaires connues pour leur implication dans le recrutement et l'activation de différentes voies de signalisation (567-569-702-719-728-935 et 745 qui sert de contrôle). Ces tyrosines sont ensuite réintroduites une à une dans le récepteur qui est transfecté dans la lignée myéloïde 32D. Les capacités de survie, de prolifération et de migration cellulaire sont analysées <sup>164</sup>.

Cette étude montre que la restauration des tyrosines 567 et 569 seules ou en combinaison rétablit la prolifération d'environ 30% à 40% et la migration à 100%, suggérant le rôle du site dans ces deux fonctions. En terme moléculaire, la restauration conduit à une réactivation des voies MAPK ERK et JNK, à une phosphorylation de AKT et à une réactivation de l'activité kinase de FYN.

De manière surprenante dans cette étude, la restauration du site Y567-569 est la seule restauration qui rétablit certaines fonctions cellulaires. Toutes les autres n'ont aucun effet, ce qui est particulièrement intrigant en ce qui concerne la restauration du site de recrutement de la PI3K Y719.

Quoi qu'il en soit, il est à noter que la restauration du site ne rétablit la prolifération que de moitié suggérant que d'autres voies pourraient être impliquées dans la

fonction proliférative. Il pourrait s'agir d'un mécanisme synergique avec d'autres voies et il serait intéressant pour répondre à cette question de restaurer plusieurs tyrosines en combinaison.

### **c- Etude *in vitro* de mutants ponctuels Y->F**

L'étude des mutants ponctuels KIT-Y568-570F a montré à plusieurs reprises le rôle fondamental de la plateforme dans la prolifération et la migration dépendante du SCF, et incrimine le plus souvent les SFK comme mentionné précédemment.

Une étude a exploré l'implication des différentes tyrosines intracellulaires de KIT dans le **chimiotactisme vers le SCF**<sup>180</sup>.

Introduit dans des cellules Ba/F3, le récepteur KIT sauvage confère aux cellules une capacité de migration chimiotactique vers le SCF. Les auteurs ont analysé cette migration suite à la substitution de chacune des tyrosines intracellulaires de KIT. Sur les 22 mutations testées, seules les mutations des tyrosines 567, 569 et 719 réduisent considérablement la migration. Un résultat similaire est obtenu suite à l'expression de la kinase Csk qui régule négativement l'activité des SFK suggérant que la migration est dépendante des SFK. La migration est aussi réduite par des traitements aux inhibiteurs U0126, SB203580, et LY294002 qui bloquent respectivement les voies MAPK ERK et p38 et la voie PI3K, quoi que ces inhibiteurs soient utilisés à des doses particulièrement élevées.

Ainsi il existe une coopération entre les sites Y567-569 et Y719 pour la migration dépendante du SCF, vraisemblablement médiée par les voies SFK et PI3K convergentes sur les MAPK.

Plusieurs études se sont penchées sur le rôle de ce site dans la **prolifération**.

(i) Lennarston et al ont montré une prolifération réduite de cellules PAE transfectées par KIT-YY568-570FF<sup>173</sup>.

(ii) Des BMMCs *Kit* <sup>-/-</sup> transduites par mKIT-Y567F ont une capacité de prolifération réduite de 50% par rapport aux cellules contrôles transduites avec KIT WT. Dans ces cellules on ne détecte plus d'activité kinase de FYN. De plus, les cellules transduites avec mKIT-Y567F-Y719F ne sont plus du tout capables de répondre au SCF, suggérant une synergie entre les voies PI3K et SFK dans la fonction de prolifération<sup>174</sup>.

(iii) Dans une étude visant à comprendre la synergie entre KIT et EpoR, Tan et al ont montré un défaut de prolifération en réponse au SCF d'une lignée proerythroïde G1E-ER2 transfectée avec mKIT-Y567F, mKIT-Y569F ou mKIT-FF<sup>179</sup>. Ils montrent par ailleurs une implication majeure du site dans la synergie avec EpoR.

(iv) Un résultat contradictoire est décrit dans l'étude de Kozlowski et al décrivant l'interaction sur le site Y567-Y569 des tyrosine phosphatases SHP1 et SHP2. Ces travaux montrent une augmentation de la prolifération SCF-dépendante des cellules Ba/F3 exprimant les mutants Y567F et Y569F<sup>207</sup>.

#### **d- Conclusions**

En conclusion, il semble que le motif dityrosine Y568-570 (mY567-569) soit impliqué dans les fonctions de prolifération et de migration dépendantes du SCF. Le motif a un rôle nécessaire et sans doute suffisant dans la migration cellulaire *in vitro*. Ce résultat corrèle avec le défaut majeur dans les compartiments mélanocytaires et mastocytaires des animaux transgéniques, deux compartiments qui sont entièrement dépendants de la migration des cellules primordiales au cours du développement embryonnaire. Concernant la fonction de prolifération, malgré des données contradictoires, il semble qu'il se dégage un rôle nécessaire mais non suffisant des tyrosines dans la prolifération dépendante du SCF agissant en synergie avec d'autres tyrosines/voies.

#### **2-A-2-4- Les fonctions connus du motif dityrosine dans le contexte du récepteur KIT activé/oncogénique**

Jusqu'ici une seule étude a abordé le rôle du motif dityrosine Y568-Y570 dans le contexte du récepteur activé KIT<sup>D816V</sup>. L'objectif de cette étude récente menée par l'équipe de Ronnstrand était d'étudier l'implication des SFK (i) dans la dégradation et la signalisation du récepteur KIT<sup>D816V</sup> ainsi que (ii) dans la prolifération indépendante de cytokines de cellules Ba/F3 exprimant KIT<sup>D816V</sup><sup>411</sup>.

Ils décrivent une plus faible expression de surface du récepteur KIT<sup>D816V</sup> (par rapport au récepteur sauvage), ainsi qu'une phosphorylation constitutive de Cbl corrélant avec une ubiquitination permanente du récepteur. (Ils proposent donc que

le faible niveau d'expression en surface soit lié à une augmentation de la dégradation). Pour connaître le rôle des SFK dans ces deux phénomènes, ils utilisent (i) un traitement avec l'inhibiteur des SFK SU6656 et (ii) des cellules exprimant le récepteur portant la mutation Y568F en plus de la mutation 816. Les deux tests n'ayant aucun effet, ils concluent que, contrairement au récepteur WT, les SFK ne sont pas requises dans les processus conduisant à l'internalisation du récepteur. Ils observent que des voies de signalisation normalement dépendantes de l'activité des SFK (phosphorylation de ERK et SHC) sont elles aussi insensibles à l'inhibition des SFK dans le contexte de KIT<sup>D816V</sup>. Des tests d'activité kinase *in vitro* sur des peptides après immunoprécipitation montrent que la kinase 816 est capable de phosphoryler des peptides de type Abl ou Src. Ils concluent donc à un changement de la spécificité catalytique de la kinase, responsable d'un contournement du rôle normal des SFK par le mutant 816. Ils montrent alors que la mutation Y568F, si elle est létale dans le contexte du récepteur sauvage, a plutôt un effet positif dans le contexte de KIT<sup>D816V</sup>, en croissance liquide et en milieu semi solide.

### 2-A-3- Objet de ce travail expérimental

L'ensemble des données disponibles suggère un rôle fondamental du motif dityrosine dans la physiologie du récepteur KIT sauvage. L'objectif de l'étude réalisée au cours de cette thèse était de comprendre l'implication du motif dans la transformation cellulaire dépendante de l'oncogène KIT<sup>D816V</sup> dans le modèle des cellules mastocytaires transformées.

Cette question a été étudiée **sur le plan moléculaire** d'abord par une analyse globale des interactions sur le site dans les mastocytes. Ensuite, la perte du site par mutation dans le contexte d'un récepteur activé a été analysée (i) en terme de signalisation intracellulaire et (ii) en terme de profil transcriptionnel.

**Sur le plan fonctionnel**, l'implication du site dans la transformation cellulaire a été analysée *in vitro* dans des tests fonctionnels relatifs aux fonctions de KIT et *in vivo* dans un modèle de leucémogénèse chez l'animal.

## **2-B- Résultats des travaux**

Nous présentons les principaux résultats de cette étude en français. Les figures jointes sont légendées en anglais.

### **2-B-1- Caractérisation des Interactions sur la plateforme Y568-Y570**

#### **Figure 1: Numerous signaling molecules interact on KIT<sup>D816V</sup> dityrosine motif Y568-Y570**

##### **(A) and (B) Peptide pull-down assays**

Four peptides encompassing the dityrosine motif Y568-Y570 in each possible state of phosphorylation were used in affinity pull down assays in HMC-1 extracts. Y stands for non-phosphorylated tyrosine; pY indicates phosphorylated tyrosine

##### **(A) Silver-stained protein gel**

Bound proteins were separated by SDS-PAGE and visualized by silver staining. Uncoupled saturated beads were used as a control of specific binding. Proteins were then extracted from the gel and analyzed by mass spectrometry after trypsin digestion. The band signaled by a star was identified as STS-1.

##### **(B) Western-blotting**

Protein identification was confirmed by western-blotting using specific antibodies. Cell lysate is used as a positive control for protein detection.

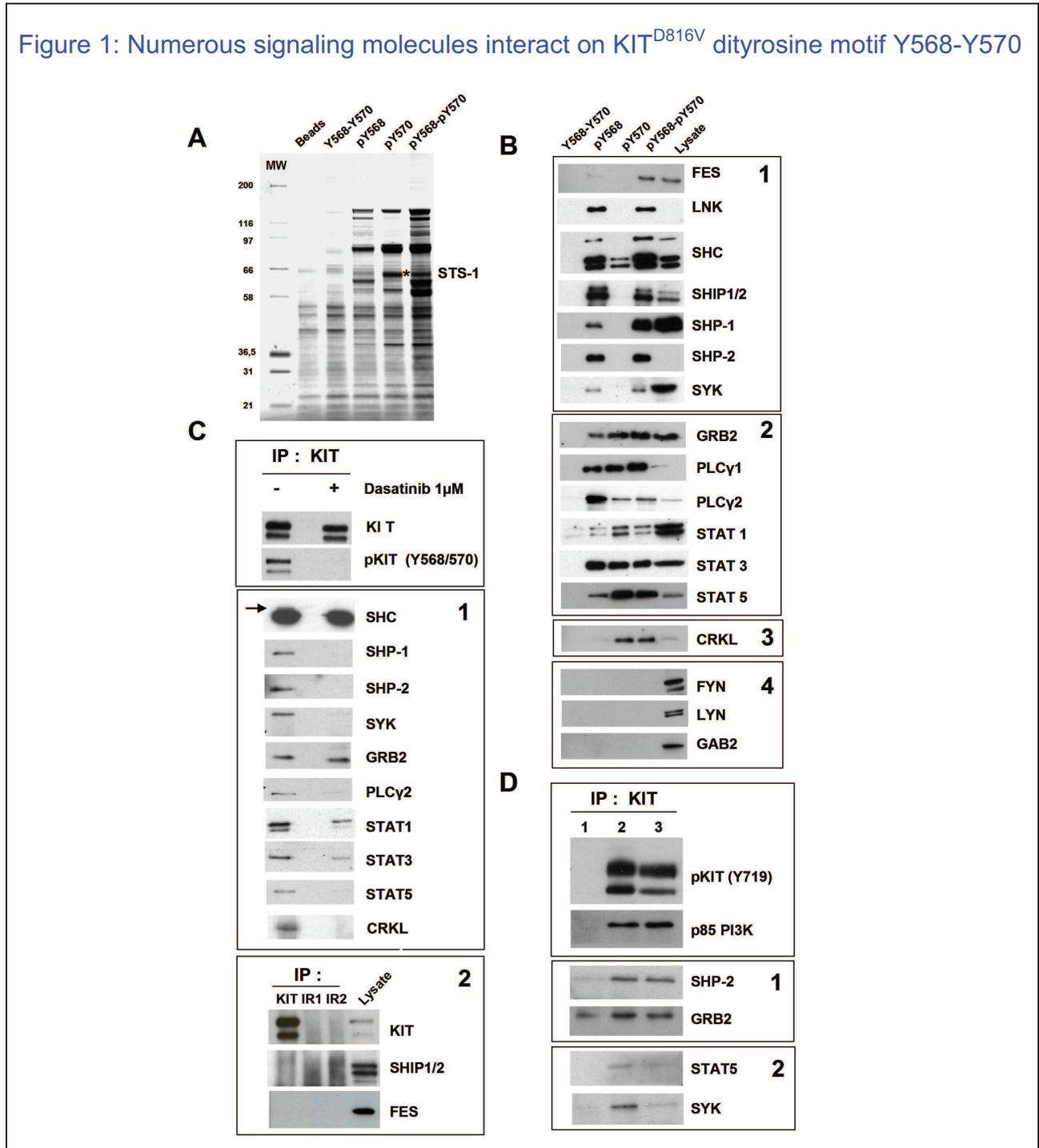
##### **(C) Co-immunoprecipitation of endogenous proteins in HMC-1 cells**

Immunoprecipitations of KIT (or control irrelevant antibodies IR) were performed in HMC-1 cells that were or not pre-treated with dasatinib (1 $\mu$ M) for 1h30. Associated partners were revealed by western-blotting.

##### **(D) Co-immunoprecipitation of endogenous proteins in Ba/F3 cells**

KIT was immunoprecipitated from Ba/F3 cells stably transfected with either hKITD816V (lane 2) or hKIT YY568-570FF-D816V (lane3). Parental Ba/F3 cells (lane1) are used as a control of irrelevant IP. Bound interactors were analyzed by western-blotting.

Figure 1: Numerous signaling molecules interact on KIT<sup>D816V</sup> dityrosine motif Y568-Y570



Nous avons tout d'abord développé une approche biochimique afin d'identifier les partenaires du site dans un modèle de lignée de mastocytes. La lignée HMC-1.2, dérivée à partir d'un patient atteint d'une leucémie à mastocytes, est la seule lignée humaine de mastocytes disponible<sup>488</sup>. Dans ces cellules le récepteur KIT porte deux mutations activatrices qui sont les substitutions V560G et D816V<sup>489</sup>.

L'objectif de cette partie était de faire un état des lieux des interactions sur le site dityrosine juxtamembranaire Y568-Y570 dans un **modèle homogène et par une**

**approche non biaisée.** Des peptides (15-mers) correspondant à la séquence du domaine JM contenant le motif dityrosine couplés à des billes ont été utilisés dans des expériences de précipitations d'affinité dans des lysats de cellules HMC-1. Ces peptides ont été synthétisés dans leurs quatre états possibles de phosphorylation, c'est-à-dire le peptide non phosphorylé (Y568-Y570), les tyrosines 568 ou 570 phosphorylées seules (pY568 et pY570 respectivement) ou le motif biphosphorylé (pY568-pY570). Les protéines co-précipitées avec les différents peptides ont été séparées sur gel SDS-PAGE et visualisées à l'aide d'une coloration au nitrate d'argent (Figure 1A). Les « bandes » apparaissant de manière spécifique dans les précipitations réalisées avec les peptides phosphorylés par rapport au peptide non phosphorylé ont été découpées du gel, digérées par de la trypsine et analysées par spectrométrie de masse MALDI-TOF. Cette expérience (répétée deux fois de manière indépendante) a conduit à l'identification de 16 protéines à domaine SH2 capables d'interagir sur le site phosphorylé. Excepté pour la protéine STS-1 (visualisée par une étoile sur la figure 1A) pour laquelle nous ne disposons pas d'anticorps, l'identification de toutes les protéines a été confirmée en western blot (Figure 1B). Ces protéines sont : les phospholipases PLC $\gamma$ 1 et PLC $\gamma$ 2, les inositols phosphatases SHIP1 et SHIP2, ainsi que les tyrosine phosphatases SHP1 et SHP2, les facteurs de transcription STAT1, STAT3, STAT5, les kinases FES et SYK, et les adaptateurs GRB2, SHC, LNK et CRKL. Dans le panel 1 de la figure B sont regroupées les protéines se fixant majoritairement sur la tyrosine 568 phosphorylée, dans le panel 2 les protéines interagissant indifféremment avec l'une ou l'autre des tyrosines et dans le panel 3, celles se liant préférentiellement à la tyrosine 570 phosphorylée. Toutes les protéines interagissent avec le motif biphosphorylé. Nous n'avons pas identifié ni détecté en western blot l'interaction des kinases FYN et LYN de la famille des SFK (figure 1B, panel 4). La présence de GAB2 a été testée comme contrôle négatif.

Nous avons ensuite testé la relevance de ces interactions dans les cellules par des expériences d'immunoprécipitation de KIT et d'analyse des partenaires protéiques co-précipités (Figure 1C). Excepté pour la kinase FES et les phosphatases SHIP1/2 (fig 1C, panel 2), nous avons pu mettre en évidence l'association de KIT et des différentes protéines *in cellulo*. Nous montrons par ailleurs que cette association est dépendante de l'activité kinase et de la phosphorylation de KIT. En effet, après un traitement au Dasatinib, un inhibiteur des KIT, les interactions sont perdues ou

fortement réduites (fig1C, panel 1). L'association de KIT et GRB2 est la seule exception ; elle n'est pas affectée par l'inhibition de l'activité kinase du récepteur.

Enfin, nous avons évalué le rôle du motif dityrosine dans l'association entre KIT et les partenaires décrits. Pour cela, les récepteurs KIT<sup>D816V</sup> ou KIT<sup>D816V</sup>-YY<sub>568-570</sub>FF ont été introduits dans des cellules Ba/F3 qui n'expriment pas de récepteur KIT endogène. Comme on peut le voir dans le panel 1 de la figure1D, l'association entre KIT et les protéines SHP2 et GRB2, n'est pas affectée par la mutation du site dityrosine, suggérant la présence d'autres sites de liaison. L'interaction avec la p85 est utilisée comme témoin, l'interaction prenant place sur une autre tyrosine (Y721)<sup>130 133</sup>. La redondance observée pour l'interaction n'est pas surprenante dans le cas de GRB2 dont la fixation est par ailleurs décrite sur les tyrosines 703 et 936<sup>129</sup>. A l'inverse, l'interaction entre KIT et les protéines SYK et STAT5 est largement diminuée lorsque le site dityrosine est muté, suggérant qu'il s'agit du site majeur de leur recrutement (fig1D, panel 2).

Ainsi nous avons pu mettre en évidence l'interaction de nombreuses protéines avec le motif dityrosine phosphorylé du domaine JM de KIT. Cette étude exhaustive a été réalisée dans un modèle homogène de lignée de mastocyte. Ces protéines sont toutes impliquées dans la signalisation intracellulaire et suggèrent un rôle majeur du motif comme plateforme de recrutement et d'activation de la signalisation issue du signalosome de KIT.

**Afin d'étudier le rôle fonctionnel de la signalisation émanant du motif, le récepteur KIT<sup>D816V</sup> ainsi que les différents mutants des tyrosines ont été introduits dans des cellules Ba/F3 qui n'expriment pas de récepteur KIT endogène. Ces cellules ont été comparées *in vitro* dans des tests fonctionnels relatifs à l'activité de KIT et *in vivo* dans un modèle de leucémogénèse induite dans des souris *nude*.**

## **2-B-2- Rôle de la plateforme Y568-Y570 dans la transformation cellulaire induite par KIT-D816V**

### **Figure 2: Enhanced transforming capacity of Y568-Y570 deficient cells**

#### **(A) Platform Y568-Y570 is dispensable for KIT<sup>D816V</sup>-induced proliferation in liquid medium**

**Growth Kinetics** of BaF3-KIT-D816V cells was compared to both single (BaF3-KIT-D816V-Y568F or BaF3-KIT-D816V-Y570F) and double mutant cells BaF3-KIT-D816V-YY568-570FF. Cells were seeded in triplicates in normal liquid medium containing 10% FBS without cytokine in 96-well plates and cell count was assessed every 24 hours by luminescence using TiterGlow reagent (Promega, France) as described in “materials and methods”.

#### **(B) Platform Y568-Y570 negatively affects growth in semi-solid medium**

BaF3-KIT-D816V cells and double mutant cells BaF3-KIT-D816V-YY568-570FF were subjected to **colony formations assays in methylcellulose**. Representative sections were photographed after 7 to 8 days of culture at optical magnification 1,6 (upper picture) and 40 (lower pictures). Colonies in three independent wells were counted with indicated standard deviation to the mean as shown on the histogram. The figure show a representative experiment out of three made independently.

#### **(C) Platform Y568-Y570 negatively affects tumorigenicity of BaF3-KIT<sup>D816V</sup> cells in nude mice**

Kaplan-Meier plot of survival of nude mice receiving parental BaF3 cells or BaF3 cells expressing the different KIT<sup>D816V</sup> constructs as indicated. The graph represents the poll of two independent experiments obtained with respectively 3 and 5 mice.

### **Figure 2- Supplementary data**

Proliferation of BaF3-KIT-D816V cells was compared to both single (BaF3-KIT-D816V-Y568F or BaF3-KIT-D816V-Y570F) and double mutant cells BaF3-KIT-D816V-YY568-570FF in different assays. Cells were seeded in triplicates in 96-well plates and cell count was assessed at the indicated time point by luminescence using TiterGlow reagent (Promega, France) as described in “materials and methods”.

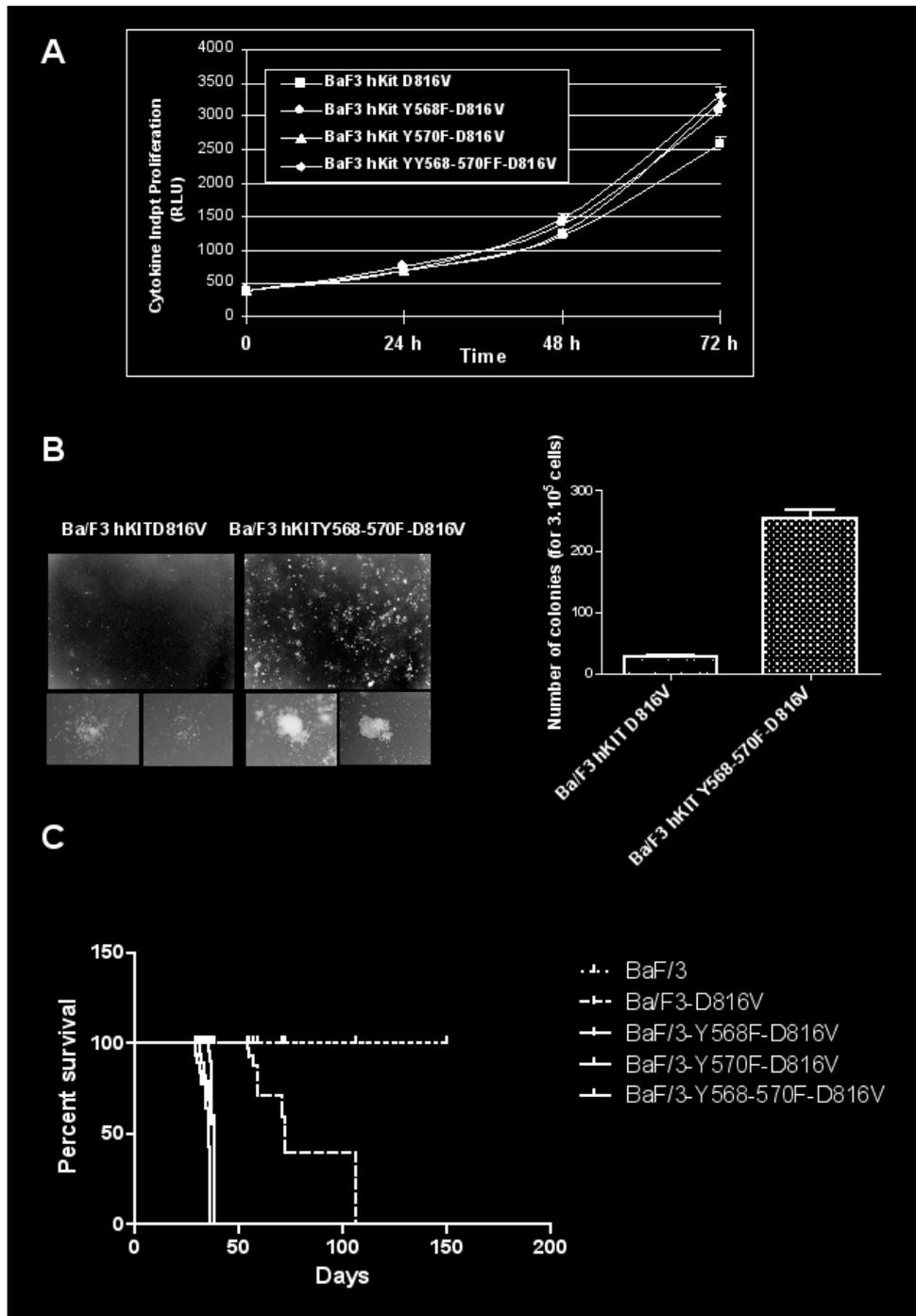
**(A)** Cell count was assessed 48h after growth in normal medium containing the indicated concentration of imatinib (left panel) or dasatinib (right panel). Cell proliferation is represented as the absolute percentage compared to untreated cells.

**(B)** Cells were grown in medium containing growing percent of FBS (0,5% to 10%). Cell proliferation is represented as the growth rate during a 24h period of time.

**(C)** Cell count was assessed 48h after growth in media containing growing concentration of glucose (low glucose media is 3mM, physiological glucose is 5mM, normal glucose is 10mM and high glucose is 25mM). Cell proliferation is represented as the absolute percentage compared to cells grown in normal RPMI medium wich is 10mM glucose.

All experiments were performed trice independently. Graphs show a representative experiment with indicated standard deviation to the men for each triplicate.

Figure 2 : Enhanced transforming capacity of Y568-Y570 deficient cells



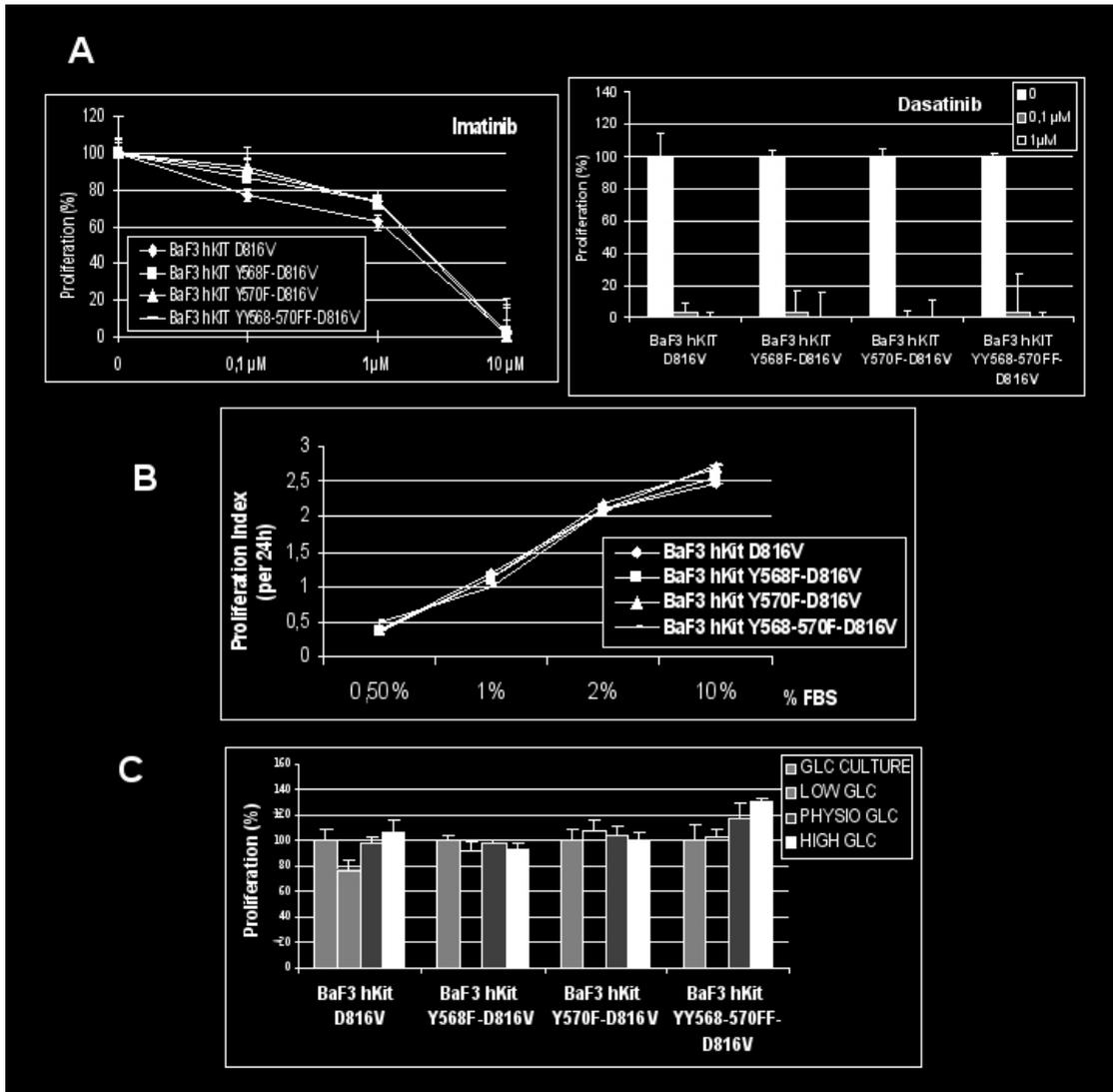


Figure 2 - Supplementary data

La mutation du motif dityrosine n'a pas d'effet différentiel sur cette prolifération en milieu liquide (Figure 2A), et ce en condition de pousse optimale (milieu complet contenant 10% de FBS), ou en conditions de stress tels que la privation de sérum ou de glucose (figure 2 supplémentaire B et C) ; de stress génotoxique au cisplatine (non montré); de croissance en présence d'inhibiteurs de kinases (figure 2 supplémentaire A). Cependant, lorsque les cellules sont mises en culture dans un milieu semi solide (methyl-cellulose), il existe une différence nette dans la capacité des différents mutants à former des colonies. Alors que les cellules Ba/F3-KIT<sup>D816V</sup> forment peu de colonies à l'aspect diffus, les cellules portant la double mutation Ba/F3-KIT<sup>D816V</sup>-YY<sub>568-570</sub>FF forment des colonies plus nombreuses et beaucoup plus compactes (Figure 2B). Le signal émanant de la plateforme 568-570 semble donc être un signal plutôt négatif sur

la capacité des cellules à former des colonies en méthyl-cellulose et à proliférer sans ancrage. Le même résultat est obtenu avec des cellules EML, suggérant que la différence est bien une propriété intrinsèque du motif dityrosine, indépendamment du contexte cellulaire (non montré).

Ces cellules ont finalement été comparées pour leur capacité transformante *in vivo* par l'étude de leur potentiel leucémogène chez l'animal. Les différents mutants de cellules Ba/F3 transformées par KIT<sup>D816V</sup> injectées dans la circulation sanguine de souris *nude* sont à l'origine du développement d'une leucémie mortelle chez l'animal. Ceci avait été précédemment décrit dans le cas de cellules Ba/F3 transformées par les oncogènes BCR-Abl<sup>490 491</sup> et TEL-PDGFR<sup>492</sup> mais pas dans le cas de KIT<sup>D816V</sup>. Des expériences préliminaires ont été conduites afin de déterminer le nombre de cellules à injecter pour le développement de la leucémie (100 000 cellules par animal par la suite). Par ailleurs le suivi des animaux dans les expériences de survie a été réalisé de manière strict avec un sacrifice des animaux diagnostiqués mourants sur trois critères : perte de masse corporelle, poil hirsute, animaux prostrés (en perte de mobilité). Le suivi de la survie des animaux a révélé une différence majeure de cinétique de mortalité liée aux différents mutants de la plateforme Y<sub>568</sub>-Y<sub>570</sub>. Les souris ayant reçu les cellules Ba/F3-KIT<sup>D816V</sup> ont une médiane de survie de 72 jours alors que les souris ayant reçu les cellules Ba/F3-KIT<sup>D816V</sup> mutées sur la plateforme ont une médiane de survie réduite à 37 jours (Figure 2C). Ces expériences ont été reproduites deux fois de manière indépendante avec trois puis cinq animaux par groupe. La reproductibilité totale des résultats a permis de regrouper les données issues des deux expériences et l'analyse de la survie selon une représentation de Kaplan Meier présentée figure 2C regroupe les données des deux expériences, soit huit animaux par groupe.

L'ensemble de ces résultats nous amène à conclure qu'un signal ayant un effet négatif sur la transformation cellulaire est perdu lorsque le motif dityrosine Y568-Y570 est muté.

KIT est impliqué dans plusieurs fonctions cellulaires différentes telles que la prolifération mais aussi l'adhésion et la migration. Nous avons ensuite testé l'implication du motif dityrosine dans d'autres fonctions pouvant expliquer la différence de pouvoir transformant observée.

## **2-B-3- Rôle de la plateforme Y568-Y570 dans la migration cellulaire induite par KIT-D816V**

### **Figure 3: Reduced migration and homing to lymphoid organs of Y568-Y570 deficient cells**

**(A)** BaF3-KIT-D816V cells and double mutant cells BaF3-KIT-D816V-YY568-570FF were compared in their ability to migrate towards FBS in modified Boyden chambers. Starved cells, pretreated with dasatinib for one hour or not (W/O dasatinib), were seeded in the upper chamber ( $10^5$ ) and allow migrating to the lower chamber containing 20% FBS or not (W/O FBS) for one hour. Cell migration is represent as the absolute value of the ratio of lower chamber cells on total seeded cells. The graph represents the pool of three independent experiments, each done in triplicates, with indicated standard deviation. Unpaired Mann-Whitney test confirm that groups are statically different.

**(B)** Fluorescent red-stained BaF3-KIT-D816V cells and green-stained BaF3-KIT-D816V-YY568-570FF cells were mixed in equal proportion and put into nude mice by retro-orbital injection. Mice were sacrificed 3h or 24h later and cells were traced in different organs as mentioned. Graph shows the ration of red cells on green cells. A representative experiment comprising 5 injected animals and a control NaCl injected mice is shown out of three experiments made independently. Statistical analysis....

### **Figure 3 - Supplementary data**

Location of BaF3-KIT<sup>D816V</sup> stably expressing EGFP fluorescent dye was traced by FACS in different lymphoid organs when mice were diagnosed to be sacrificed.

Organs analyzed were the spleen, the bone marrow, the blood and either maxillary or mesenteric lymph nodes. Population gated corresponds to a hematopoietic FSC-SSC gate and green cells were visualized using NaCl injected mice as control.

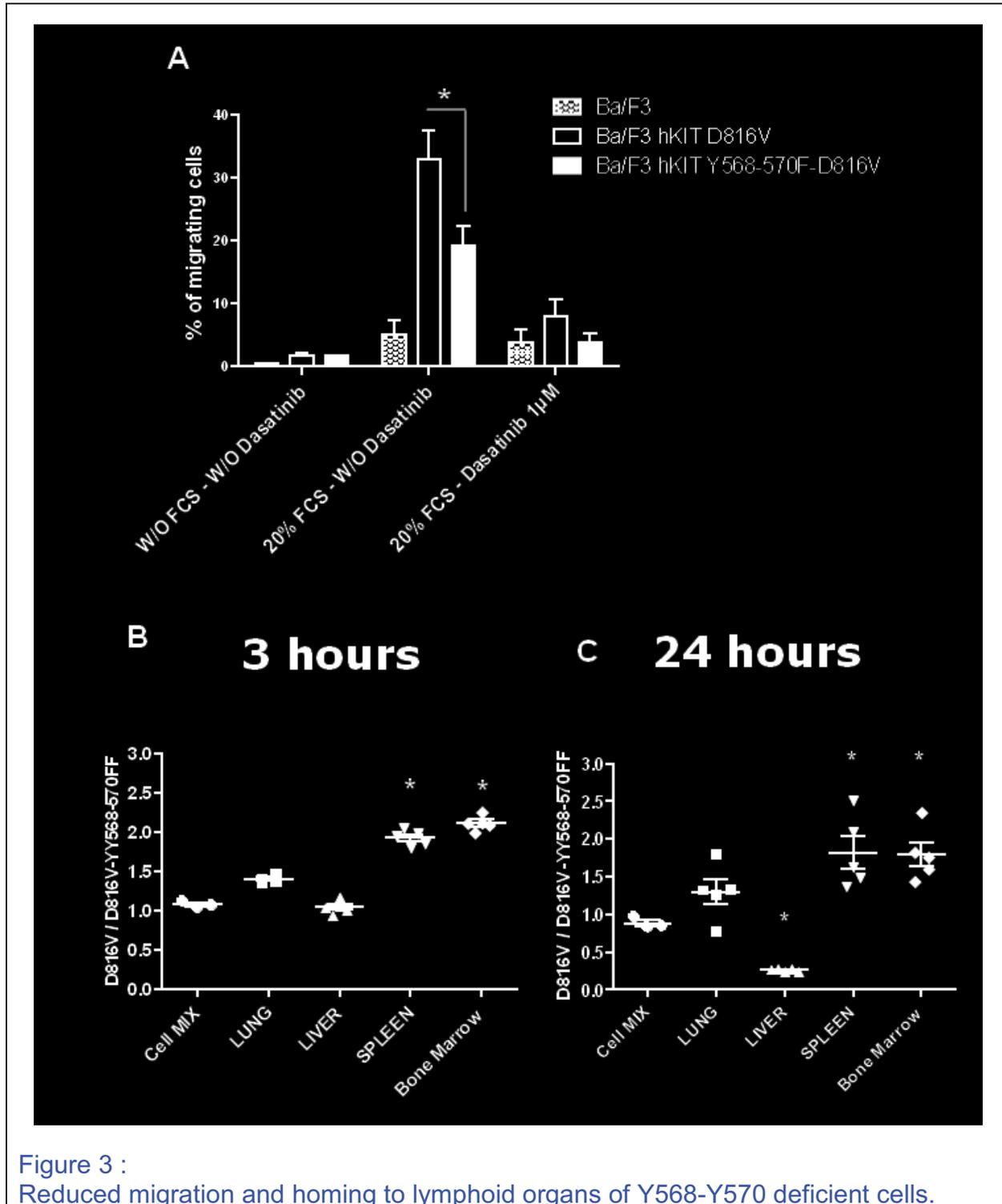
### **Figure 4: Cell adhesion to fibronectin induced by KIT<sup>D816V</sup> is not dependent on the dityrosine motif Y568-Y570**

#### **(A) End-point adhesion**

Starved Ba/F3-KITD816V +/- Y568-570F cells were plated on fibronectin coated plates and the percentage of adherent cells was estimated after one hour as the ratio of adhering on plated cells as indicated in "materials and methods". The graph represents the pool of three independent experiments with indicated standard deviation. Unpaired Mann-Whitney test confirm that groups are not statically different.

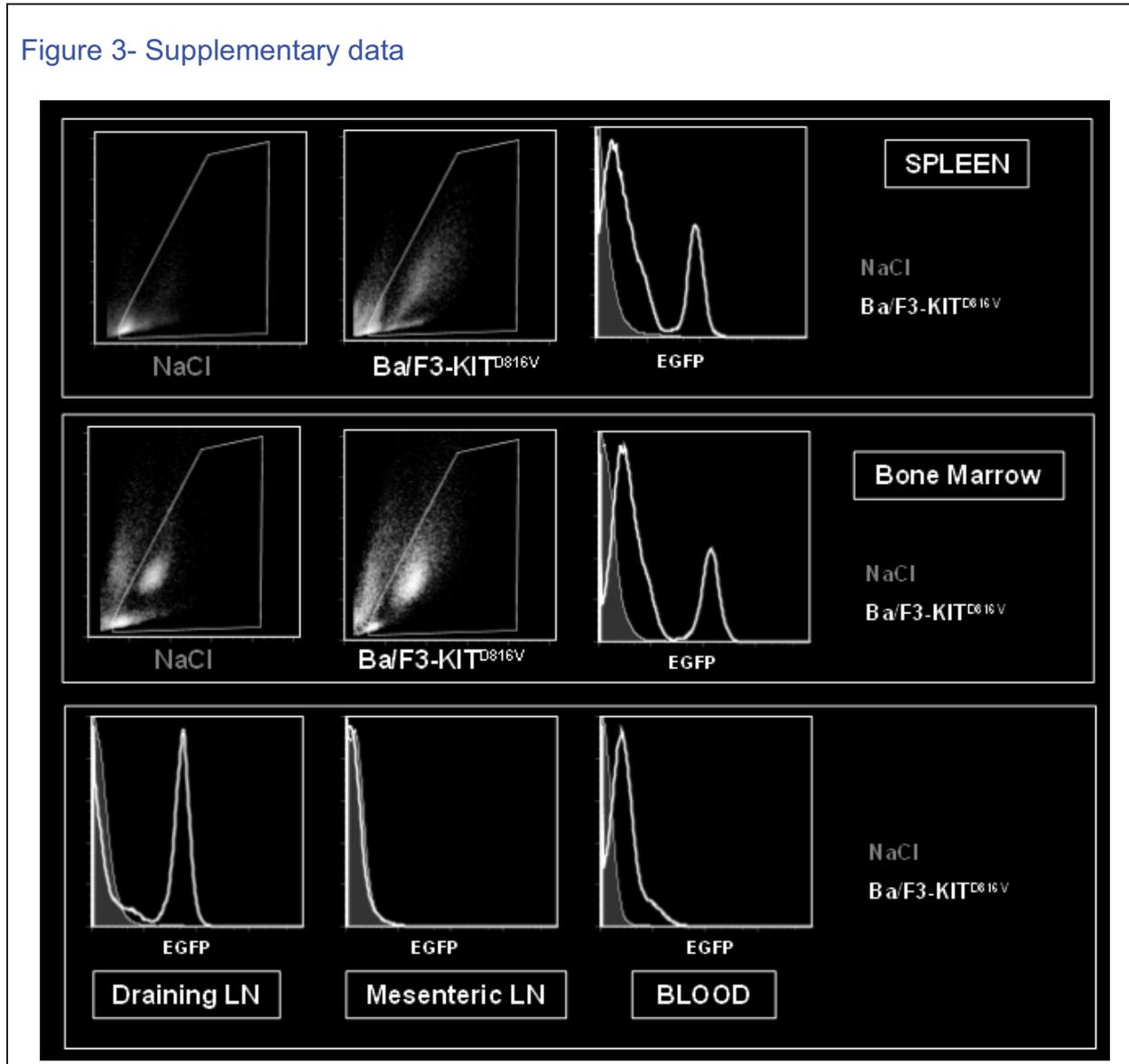
#### **(B) Adhesion Kinetics**

The same ratio was determined at different time points of adhesion. Again no statistical differences were observed.



Le récepteur KIT<sup>D816V</sup> introduit dans des cellules Ba/F3 induit une migration cellulaire vers le sérum (figure 3A), indépendante de la présence de SCF (non montré). Des tests de migration en chambre de Boyden ont révélé un défaut de migration d'environ 40% des cellules doubles mutantes YY568-570FF (Fig 3A). Le signal émanant de la plateforme 568-570 semble donc être un signal plutôt pro-migratoire *in vitro*.

Figure 3- Supplementary data



Cet effet a ensuite été testé *in vivo*. Des expériences préliminaires à l'aide de cellules co-exprimant les différents mutants de KIT et la fluorescence EGFP ont révélé la présence des cellules injectées dans les organes lymphoïdes primaires tels que la rate et la moelle osseuse ainsi que dans le ganglion axillaire qui draine la zone de l'injection (figure 3 supplémentaire). Les cellules fluorescentes sont indétectables dans le sang, suggérant les cellules ne s'installent pas dans le sang (figure 3 supplémentaire).

Les cellules Ba/F3-KIT<sup>D816V</sup> et Ba/F3-KIT<sup>D816V</sup>-YY<sub>568-570</sub>FF ont été comparées *in vivo* pour leur capacité de homing dans différents organes et dans la cinétique de colonisation de ces compartiments. Pour cela, les deux types de cellules ont été repérés à l'aide d'un marquage fluorescent différent, et un mélange équicellulaire a été injecté dans des souris *nude*. Le « homing » précoce des cellules (supposé

indépendant de la prolifération) a été analysé 3 heures post-injection et le devenir des cellules a été regardé 24 heures après l'injection. Les cellules sont repérées lors d'une analyse en cytométrie en flux des cellules de différents organes (poumon, foie, rate, moelle osseuse) mises en suspension. L'analyse de chaque groupe (contenant cinq animaux) est faite par rapport à une souris témoin injectée avec du NaCl et les cellules sont repérées dans une fenêtre FSC-SSC définie à l'aide de la suspension cellulaire initialement injectée.

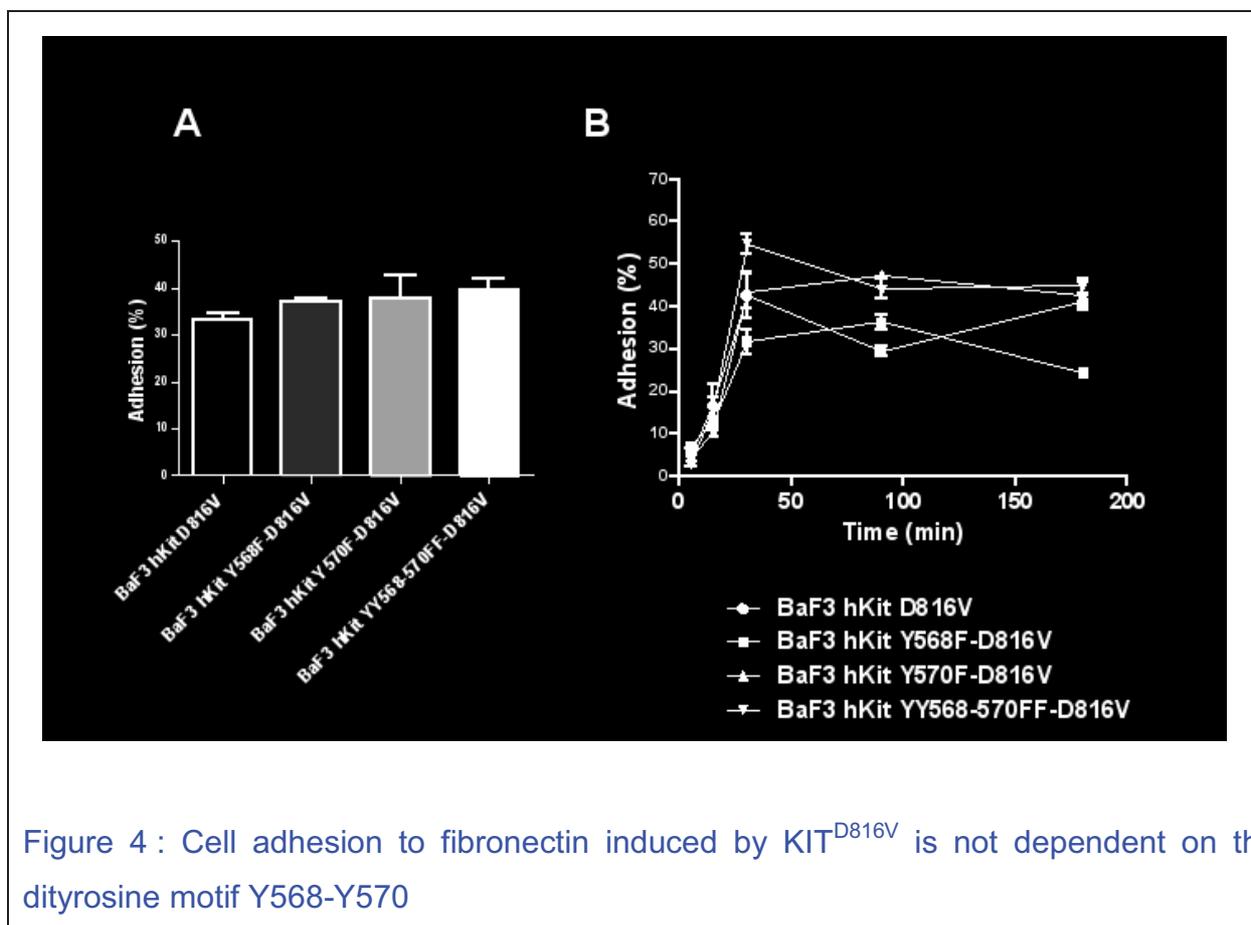
Les résultats à trois heures révèlent que deux fois plus de cellules Ba/F3-KIT<sup>D816V</sup> que de cellules mutées sur les tyrosines ont rejoint la rate et la moelle osseuse (Figure 3B). La présence d'un nombre équivalent de cellules (ratio de 1 identique à la suspension initiale) dans les poumons et le foie permet de contrôler l'expérimentation. Par ailleurs, la présence initiale des cellules dans le foie et les poumons, des organes hautement irrigués par la circulation sanguine, est considéré comme passive par opposition à la présence dans les organes lymphoïdes (OLs) qui résulte d'une migration active (homing). Ainsi cette expérience révèle qu'il existe une différence de migration cellulaire active et spécifique vers les OLs entre les deux types cellulaires. Cette différence pourrait être liée à une vitesse de migration réduite des cellules Ba/F3-KIT<sup>D816V</sup>-YY<sub>568-570</sub>FF ou à une différence dans les capacités d'implantation in situ.

L'observation des animaux 24 heures après injection peut renseigner sur cette question (dans la limite où l'on est sûr d'observer toujours de la migration). Les analyses cinétiques ont été réalisées sur un volume identique de suspension d'organes préparés par ailleurs dans les mêmes conditions. On peut donc avoir une idée quantitative du nombre relatif de cellules présentes dans chaque compartiment aux différents temps. Les résultats (non montrés) suggèrent que le nombre total de cellules diminue entre 3 et 24 heures dans tous les organes. Ceci nous laisse penser que les cellules ne sont pas encore en division dans l'animal et que leur présence dans les différents organes résulte uniquement d'un phénomène migratoire. A 24 heures (figure 3C), dans les OLs, le ratio des deux types cellulaires diminue, se rapprochant de 1, correspondant à une augmentation du nombre de cellules Ba/F3-KIT<sup>D816V</sup>-YY<sub>568-570</sub>FF. Ceci suggère que les cellules Ba/F3-KIT<sup>D816V</sup>-YY<sub>568-570</sub>FF rejoignent la niche des OLs mais avec du retard. Par ailleurs il existe une différence majeure au niveau du foie dans lequel seules les cellules Ba/F3-KIT<sup>D816V</sup>-YY<sub>568-570</sub>FF sont présentes. Les deux types cellulaires y étaient présents en quantité équivalente 3h post-injection et ce résultat

suggère donc soit que toutes les cellules Ba/F3-KIT<sup>D816V</sup> ont quitté le foie soit qu'elles n'ont pas survécu.

Ainsi l'ensemble des données suggère que les cellules déficientes sur la plateforme Y568-Y570 ont un défaut de migration *in vitro* et *in vivo*.

Ce défaut ne semble pas lié à une diminution de la capacité d'adhésion des cellules à la matrice car l'analyse *in vitro* de l'adhésion sur fibronectine des différents mutants n'a révélé aucune différence finale (4A) ou cinétique (4B).



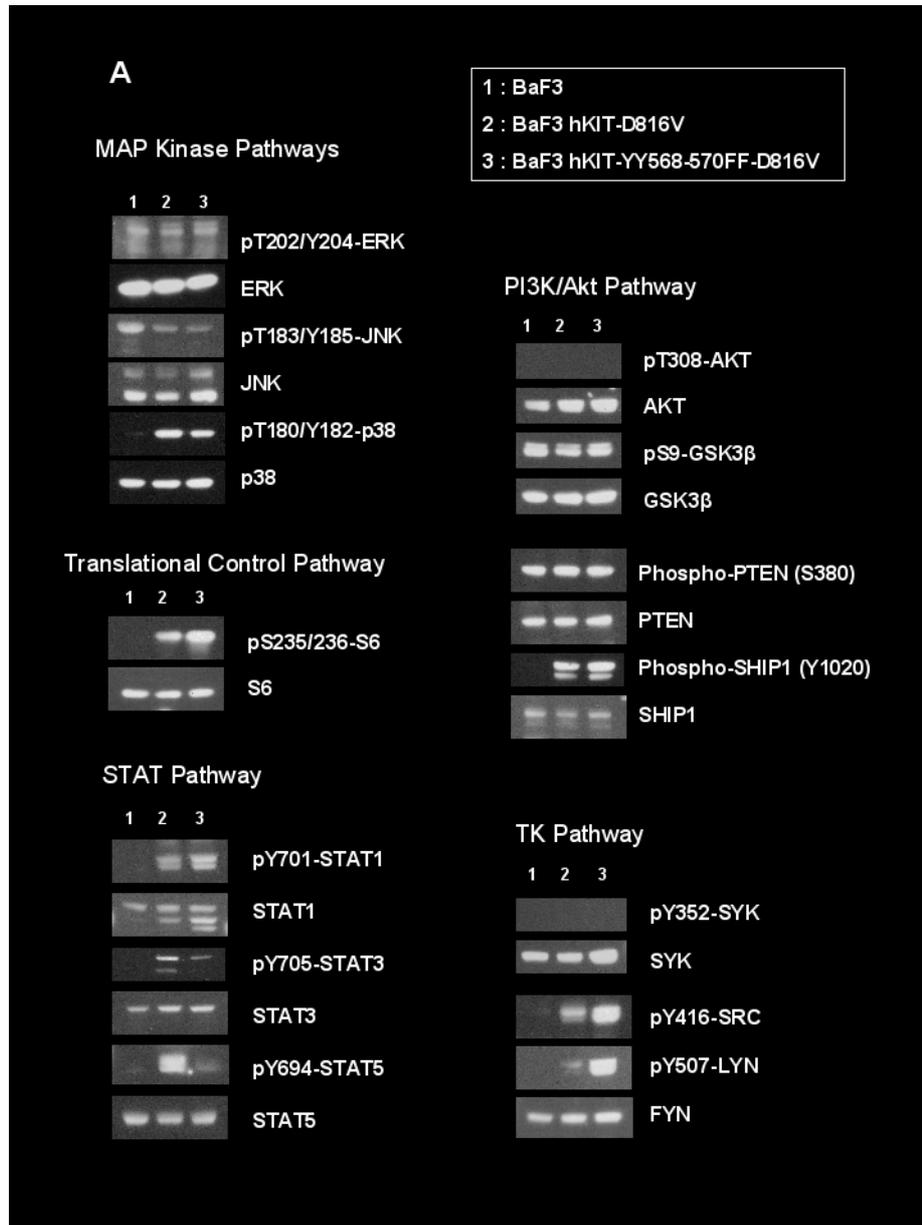
## **2-B-4- Modifications moléculaires suite à la perte de la plateforme Y568-Y570**

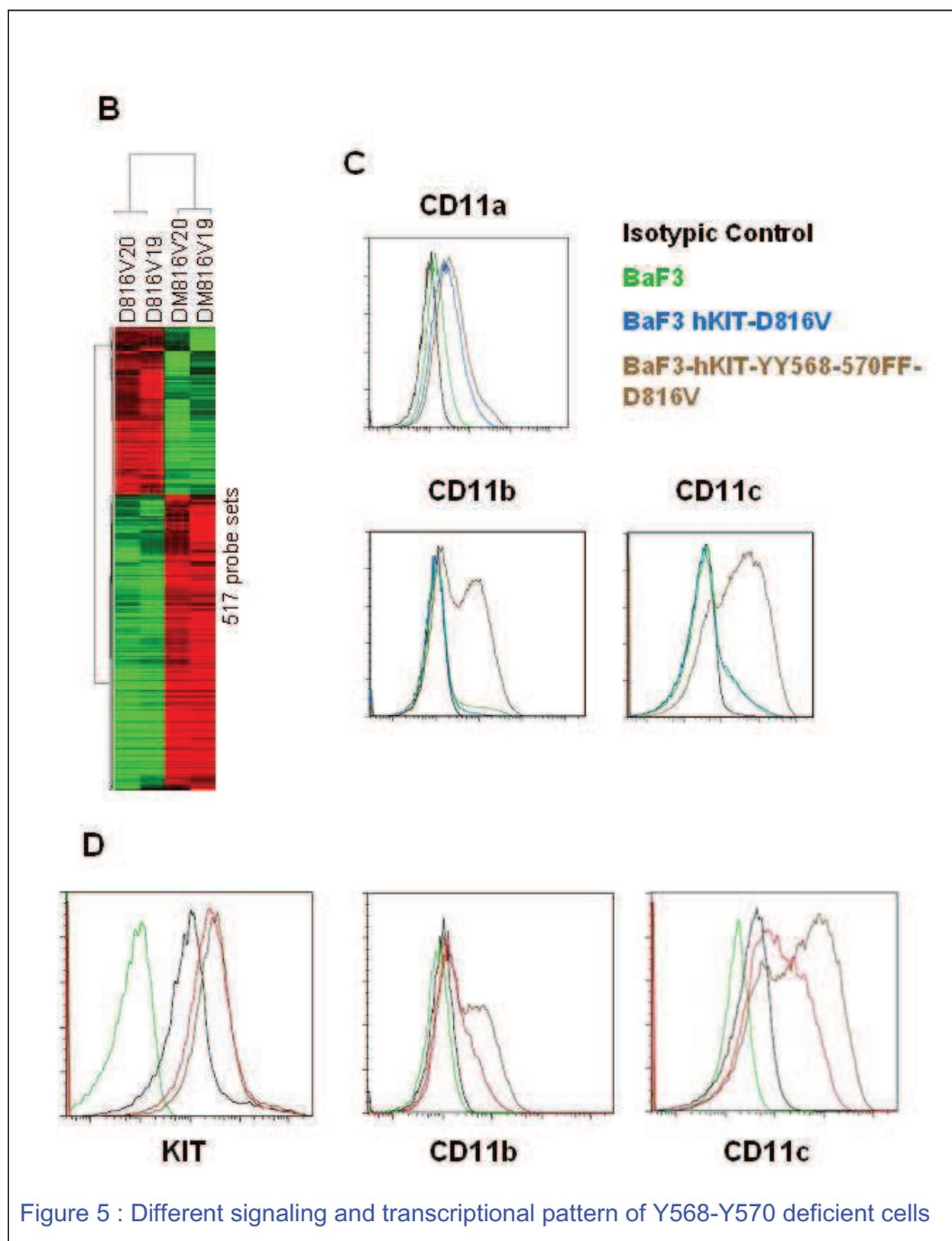
Pour tenter d'expliquer les différences observées sur le plan moléculaire, nous avons comparé les cellules Ba/F3-KIT<sup>D816V</sup> et les cellules Ba/F3-KIT<sup>D816V</sup>-YY<sub>568-570</sub>FF d'une part en terme de signalisation intracellulaire et d'autre part en terme de profil transcriptomique.

L'étude des voies de signalisation intracellulaires classiques a révélé deux différences majeures : une diminution de l'activation de STAT3 et STAT5 et une augmentation de l'activation des kinases de la famille SRC dans les cellules déficientes pour la plateforme par rapport aux cellules non mutées (Figure 5A). Par ailleurs, une légère mais reproductible augmentation du signal phospho-S6 a été observée dans les cellules doubles mutantes. Comme nous l'avons précédemment décrit <sup>379</sup>, l'activation des voies MAPK ERK et JNK ainsi que de la voie PI3K/AKT est minimale sous le mutant KIT<sup>D816V</sup> et n'est pas modifiée par la mutation du site dityrosine. La voie MAPK p38 est activée mais inchangée entre les deux types cellulaires. Les protéines GSK3 et PTEN sont actives dans les cellules Ba/F3 parentales.

La comparaison du transcriptome des cellules a révélé plus de 500 sondes correspondantes à 300 gènes d'expression variable entre les deux types cellulaires (Figure 5B). Deux extractions d'ARN indépendantes ont donné des résultats similaires (pistes 19 et 20). L'annotation ontogénique de ces gènes révèle leur implication dans le mouvement, la morphologie et le trafic des cellules. Nous avons pu confirmer une corrélation transcrit-expression protéique par analyse en cytométrie en flux de certains marqueurs membranaires comme les intégrines  $\alpha$ M (CD11b, Mac-1) et  $\alpha$ X (CD11c) dont l'expression est induite chez le double mutant (Figure 5C). L'expression membranaire de ces deux intégrines est diminuée après un traitement prolongé au Dasatinib, inhibiteur de KIT-D816 (Figure 5D, tracé rouge). Ceci suggère que l'expression du profil d'intégrines spécifique du récepteur mutant est une caractéristique cellulaire réversible dépendante de l'activité kinase de KIT dans ces cellules.

Figure 5 : Different signaling and transcriptional pattern of Y568-Y570 deficient cells





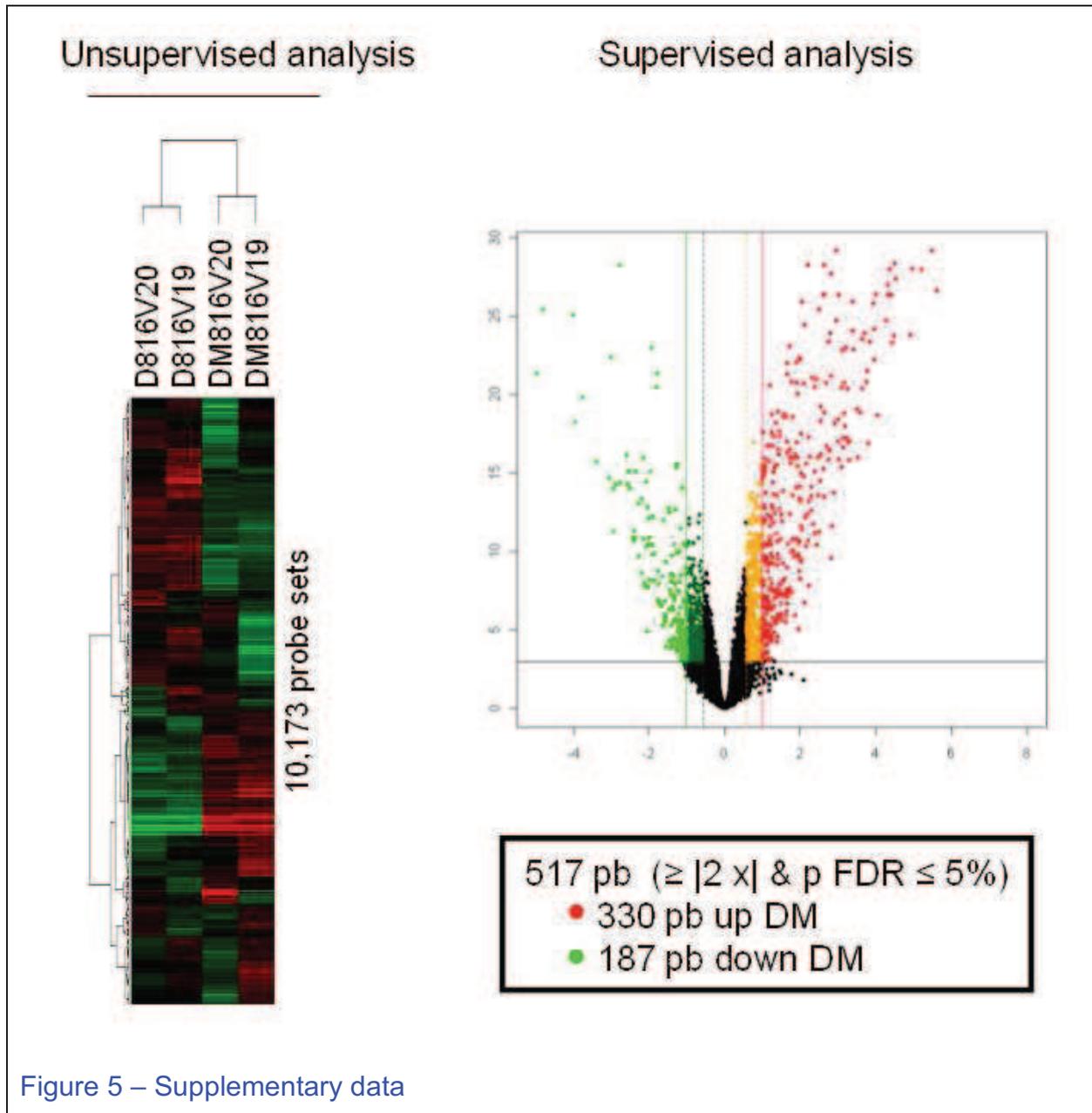


Figure 5 – Supplementary data

**Figure 5: Different signaling and transcriptional pattern of Y568-Y570 deficient cells**

**(A) Comparative analysis of classical signalling pathways**

Parental BaF3 cells and BaF3-KITD816V or BaF3-KIT-D816V-YY568-570FF cells were starved for 3 hours. SCLs were analyzed by western-blotting with indicated phospho-antibodies. Membranes were stripped and reprobed with antibodies directed against total forms of corresponding proteins. Similar results were obtained in 3 independent experiments and in independently derived stable cells.

**(B) BaF3-KITD816V and BaF3-KIT-D816V-YY568-570FF display different whole-genome transcriptional profiles.**

**Supplemental: unsupervised analysis**

Gene expression profile analysis was performed in the two BaF3 cell lines using whole-genome microarrays. Hierarchical clustering was applied to the four samples (2 for D816V and 2 for D816V-YY568-570FF coming for independent RNA extraction) and to the probe sets most variable across all samples. Samples were sorted into two large groups which correlated with the type of mutation: D816V in the right group and in the D816V-YY568-570FF left group. The two groups appeared homogeneous and very distinct from each other (correlation coefficient 0.15).

**Supervised analysis** showing the hierarchical clustering of the 517 probe sets which expression vary more than a 2 fold ratio between the two types of cells. 330 probe sets are up-regulated and shown in red, whereas down-regulated transcripts are in green.

**(C) Y568-570 deficient cells express a different integrin profile**

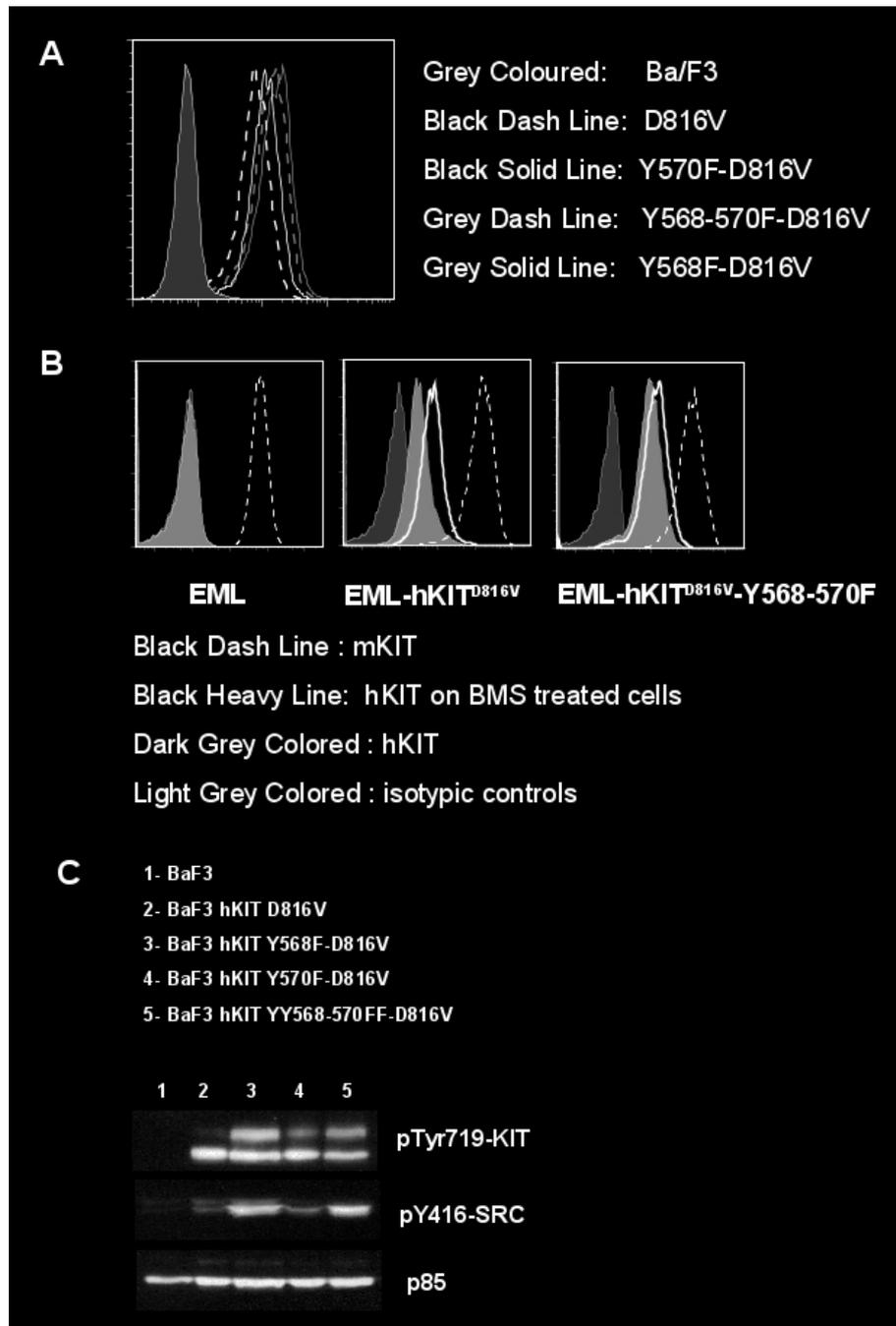
Parental BaF3 cells (green curve) and BaF3 cells expressing either KIT-D816V (blue curve) or KIT-D816V-YY568-570FF (brown curve) were subjected to FACS analysis using FITC-labeled anti-CD11a and anti-CD11b and PE-labeled anti CD11c antibodies. Matching isotypic FITC or PE-labeled antibodies were used as negative controls in all series (black curve).

**(D) Integrins expression is dependent on KIT<sup>D816V</sup> activity**

BaF3-KIT-D816V-YY568-570FF were treated for 16 hours with 10nM dasatinib (red curve) or not (brown curve) before immunostaining with either anti-CD11b-FITC, or anti-CD11c-PE or anti-KIT-PE followed by FACS analysis. In each series, parental BaF3 cells (green curve) and matching isotypic antibodies (black curve) were used as controls.

## 2-B-5- Différentes localisations subcellulaires des formes activées de KIT

Figure 6 : Different location and correlation to intracellular signaling of Y568-Y570F mutant receptor



**Figure 6: Different location and correlation to intracellular signaling of Y568-Y570F mutant receptor**

**(A) (B) KIT-D816V-YY568-570FF receptor is more present at the cell surface than KIT-D816V receptor**

**(A)** BaF3 mutant cells stably expressing indicated KIT receptor were subjected to FACS analysis using anti-hKIT-PE. Parental BaF3 cells were used as negative control (grey, colored).

**(B)** Parental EML cells (left panel) or EML mutant cells stably expressing either KIT-D816V (middle panel) or KIT-D816V-YY568-570FF (right panel) were analyzed by FACS for KIT surface expression. Untreated cells were stained with anti-hKIT-PE (Dark Grey Colored) and anti-mKIT-PE (Black Dash Line). Same staining was done on overnight dasatinib-treated cells (10nM), with anti-hKIT-PE (Black Heavy Line) and anti-mKIT-PE (not shown, identical to untreated cells). The two corresponding isotypic control antibodies were used as negative controls (Light Grey Colored) but only one is shown as they gave same result.

**(C) (D) SFK activation correlates with KIT receptor location**

SCLs from starved **(C)** BaF3 mutant cells or **(D)** EML mutant cells were analysed by western-blotting using indicated antibodies.

Les marquages de KIT en surface et l'analyse en cytométrie en flux (Figure 6A) ainsi que les profils obtenus en western blot (Figure 6C) révèlent que le mutant D816V est moins exprimé en surface que le double mutant KIT<sup>D816V</sup>-YY<sub>568-570</sub>FF. Comme décrit dans d'autres études, un traitement avec un inhibiteur d'activité kinase entraîne une augmentation de sa localisation membranaire (non montré). Ce même traitement n'a pas d'effet sur le mutant du site dityrosine (Figure 5D). La localisation membranaire du mutant de la plateforme est une propriété propre à la mutation car le même phénomène est observé dans une autre lignée cellulaire EML (Figure 6B). L'analyse de la signalisation intracellulaire des différents mutants des tyrosines dans les cellules Ba/F3 montre une corrélation entre le taux d'expression de surface et l'activation des SFK (6C).

## **2-C- Discussion**

### **2-C-1-Résumé**

1- L'utilisation de phosphopeptides et de la spectrométrie de masse nous a permis d'identifier de nombreux interacteurs de la plateforme dityrosine juxtamembranaire de KIT. La relevance de ces interactions a été démontrée par des expériences de co-immunoprécipitation des protéines endogènes ainsi que par la perte de certaines de ces interactions lors de la mutation du site.

2- La mutation de la plateforme affecte plusieurs fonctions cellulaires impliquées dans le pouvoir transformant de KIT<sup>D816V</sup> telles que la prolifération et la migration *in vitro* mais aussi *in vivo*.

3- En ce qui concerne l'output fonctionnel final dans la leucémogénèse chez l'animal, le motif dityrosine est responsable d'un signal négatif dans la transformation cellulaire et le développement pathologique.

4- Ces capacités différentes sont associées à des modifications globales du profil transcriptomique des cellules et des voies de signalisation activées en aval.

5- La localisation subcellulaire différentielle des mutants pourrait expliquer ces différences au niveau proximal.

### **2-C-2-Discussion de nos résultats**

#### **2-C-2-1- Les interacteurs de la plateforme**

Nous décrivons pour la première fois une identification globale des interacteurs du site dityrosine juxtamembranaire de KIT par une approche non biaisée utilisant la protéomique et dans un contexte cellulaire homogène de cellules mastocytaires. Cette approche nous a permis de retrouver des interacteurs déjà décrits sur le site (validation de la méthode) ainsi que d'en décrire de nouveaux.

#### **a- Détail des partenaires d'interaction**

Parmi les protéines identifiées, l'interaction de certaines était déjà décrite sur d'autres tyrosines comme c'est le cas des phospholipases PLC $\gamma$ 1 et PLC $\gamma$ 2<sup>134</sup>, et de l'adaptateur GRB2<sup>129</sup>. Notre résultat suggère que ces protéines sont recrutées de manière redondante sur KIT via plusieurs tyrosines phosphorylées.

Pour d'autres, l'interaction avec KIT était décrite sans que le site ne soit identifié comme c'est le cas pour le facteur de transcription STAT1<sup>188</sup> et les adaptateurs LNK<sup>493</sup> et CRKL<sup>494</sup>.

Pour les autres enfin, il s'agit de la première description d'une interaction avec KIT comme dans le cas des kinases SYK et FES, des phosphatases SHIP1 et SHIP2, des facteurs de transcription STAT3 et STAT5.

L'interaction des STATs sur le site est décrite dans le premier article de ce travail de thèse.

L'interaction sur le site de la kinase FES a été publiée par l'équipe<sup>417</sup>. Dans cette étude nous montrons que les kinases de la famille FES sont recrutées sur le motif dityrosine et activées suite à l'engagement du récepteur KIT sauvage par le SCF et que cette activation est indispensable à la chimiotaxie des cellules vers le SCF.

L'identification de la protéine LNK sur le site a été mis en valeur dans un travail en collaboration avec Laura Velasquez<sup>485</sup>. Cette étude décrit le rôle de LNK dans différentes fonctions dépendantes de KIT, en particulier grâce à des expériences de reconstitution dans des BMMCs issus d'animaux transgéniques *Ink*<sup>-/-</sup>. Dans cette étude nous montrons que dans des BMMCs, LNK est recruté sur la phosphotyrosine 567 ou sur le motif dityrosine biphosphorylé et activé par phosphorylation. Par ailleurs cette étude montre le rôle fondamental de LNK dans la régulation négative de la prolifération et de la migration dépendantes de KIT dans des mastocytes primaires.

Enfin une étude sur l'implication de la kinase SYK dans la migration SCF-dépendante des mélanomes est en cours, en collaboration avec Sophie Tartare-Deckert (C3M, Nice).

Dans le cas de l'interaction des phosphatases SHP1 et SHP2, nous confirmons leur liaison au site mais sans observer de différence de sélectivité Y570, Y568 respectivement comme décrit par Kozlowski<sup>207</sup>.

## **b- Analyse globale des interactions**

De manière remarquable, tous les interacteurs identifiés sont capables d'interagir avec le motif dityrosine biphosphorylé et il n'existe pas de protéines se liant spécifiquement à ce dernier. Ce résultat inattendu suggère que la phosphorylation de la tyrosine 570 ne gêne pas la reconnaissance par les domaines

SH2 spécifiques de Y568 et qu'il n'existe pas de domaines SH2 typiques du motif biphosphorylé.

Les interacteurs peuvent être néanmoins divisées en trois catégories. Ceux qui se fixent préférentiellement sur la phosphotyrosine 568 (1B1), ceux qui se fixent majoritairement sur la phosphotyrosine 570 (1B2) et enfin ceux qui se fixent indifféremment sur l'une ou l'autre des phosphotyrosine (1B3). De part la proximité des deux tyrosines, il est impossible que des protéines des catégories 1 et 2 se fixent simultanément sur le site. *In vivo* il doit donc exister une compétition entre les différents interacteurs. Nous suggérons que la localisation subcellulaire du récepteur ait une conséquence majeure sur les partenaires rencontrés.

Enfin aucune donnée ne permet de savoir si le site existe à l'état simplement phosphorylé. Il est vraisemblablement biphosphorylé initialement, suite à l'activation du récepteur. Par contre l'intervention spécifique de SHP1 pourrait conduire à la déphosphorylation de l'une ou l'autre des tyrosines mais aucune évidence expérimentale ne soutient cette hypothèse pour l'instant.

### **c- Contexte de l'interaction**

Ces interacteurs ont été identifiés en utilisant des lysats de cellules HMC-1.2 qui portent le récepteur KIT activé par les mutations V560G et D816V ainsi qu'un allèle sauvage du récepteur <sup>489</sup>. La question de savoir si ces interactions sont spécifiques d'une cellule transformée se pose donc. Cependant, cette hypothèse est peu vraisemblable dans la mesure où les interactions de LNK <sup>485</sup>, SYK (non publié), et FES <sup>417</sup> par exemple ont été reproduites dans des BMMCs exprimant KIT sauvage et que les autres interacteurs ont pour la plupart déjà été décrits dans le contexte du récepteur sauvage.

### **d- A propos des absentes...les SFK**

Parmi les partenaires connus du site, les grandes manquantes sont les SFK. Or celles-ci sont présentes et visualisées dans nos lysats de cellules HMC-1 (Figure 1, panel B4). Les expériences de peptide pull down suggèrent donc qu'elles n'interagissent pas sur le motif dityrosine. Dans le travail précédent nous avons montré que dans les cellules HMC-1, les SFK sont phosphorylées et associées à KIT. Plusieurs hypothèses pourraient expliquer ces observations. L'interaction pourrait tout d'abord

avoir lieu sur une autre tyrosine phosphorylée de KIT. Cependant, si l'interaction a lieu sur le motif dityrosine, peut-être est elle très minoritaire et notre système de détection pas assez sensible pour la visualiser. Il pourrait aussi s'agir d'un autre membre de la famille. Nous avons entre temps testé la présence de SRC, négative elle aussi. Enfin, l'interaction pourrait être indirecte, via l'association avec un autre partenaire.

#### **e- Interaction dans le contexte des protéines endogènes**

A notre connaissance, excepté pour CRKL<sup>494</sup> et SHP1<sup>207</sup>, nous montrons pour la première fois l'association de KIT et des différents interacteurs dans des expériences de co-immunoprécipitation de protéines endogènes. Les interactions de FES et SHIP n'ont pas été observées en co-immunoprécipitation, soit de part leur inexistence, soit plus vraisemblablement de part leur nature transitoire étant donnée que les deux protéines ont un rôle fonctionnel majeur dans la physiologie du récepteur.

#### **f- Analyse des interactions dans les cellules Ba/F3**

La question de la redondance des interactions, c'est-à-dire de l'existence potentielle d'autres sites de liaisons pour les partenaires identifiés, a été testée par des expériences de co-immunoprécipitation avec les récepteurs sauvage ou mutants dans le modèle Ba/F3. Cependant, pour la plupart, les interactions n'ont pas été détectables dans ce modèle, sans doute en raison du changement de contexte cellulaire. Pour celles ayant fonctionnées, nous montrons que SHP2 et GRB2 sont recrutées de manière redondante, tandis que pour STAT5 et SYK il s'agit du site majeur de recrutement.

### **2-C-2-2- Localisation subcellulaire différentielle des récepteurs mutants**

Une observation approfondie des différents mutants révèle qu'il existe en réalité une différence majeure dans leur localisation cellulaire. Le mutant 816 est majoritairement localisé en intracellulaire et ce phénomène s'aggrave au cours du temps avec in fine une perte totale de l'expression de surface. A l'inverse, le mutant FF-D816V est toujours présent en surface. Les formes membranaires et intracellulaires des récepteurs sont toutes les deux phosphorylées (figure 6C, ligne1).

Cette différence pourrait, en accord avec la littérature<sup>409 385</sup>, expliquer la différence de signalisation intracellulaire activée par les mutants. Ainsi la localisation dans un compartiment intracellulaire (réticulum endoplasmique par exemple) empêcherait le mutant 816 d'activer les SFK présentes majoritairement dans les radeaux lipidiques membranaires et favoriserait l'activation des voies STATs. La localisation majoritairement membranaire du mutant FF-D816V va de pair avec l'activation des SFK et une diminution de la phosphorylation de STAT3 et STAT5.

Les différents mutants peuvent être associés deux à deux en fonction de ce paramètre. Les récepteurs KIT-D816V et KIT-Y568F-D816V sont bloqués dans les cellules et n'activent pas ou peu les SFK, tandis que les récepteurs KIT-Y570F-D816V et KIT-YY568-570FF-D816V sont plus présents en surface et activent les SFK. Ceci suggère que ce n'est pas cette différence qui pourrait expliquer la différence de survie observée des animaux suite à l'injection des différents mutants cellulaires car dans ces expériences les mutants du motif dityrosine ségrégent ensemble par opposition au récepteur KIT-D816V.

## 2-C-2-3- Fonction de la plateforme sous KIT activé

### a- Dans les cellules en culture

#### **Prolifération en milieu liquide**

Nous n'avons pas vu d'effet de la mutation de la plateforme sur la prolifération. Ce résultat est en désaccord avec les données de l'équipe de Ronnstrand. Cependant nous soulignons le fait que les mutants stables ont été dérivés de manière indépendante à de nombreuses reprises et qu'il nous est arrivé d'observer une augmentation de la prolifération du mutant Y568F-D816V.

De manière générale, le comportement des mutants s'est révélé instable au cours du temps. Par la suite, les expériences ont été faites et reproduites dans une fenêtre précise de passage des cellules fixée à 1 mois après le début de leur croissance autonome.

#### **Prolifération en milieu semi solide**

Nous décrivons une différence majeure des cellules Ba/F3-KIT<sup>D816V</sup> et Ba/F3-KIT<sup>D816V</sup>-YY<sub>568-570</sub>FF dans leur capacité à former des colonies en méthylcellulose.

Ceci suggère une plus grande capacité des cellules portant le récepteur FF-D816 à proliférer sous forme de colonies, une caractéristique généralement associée à un plus fort pouvoir transformant. Afin de tester l'importance du contexte cellulaire dans ce résultat, les expériences ont été reproduites dans une autre lignée murine, la lignée EML. Le résultat est identique suggérant un rôle inhérent à la mutation sur le phénomène observé.

### **Migration**

Nous décrivons une diminution reproductible de 40% de la migration des cellules déficientes sur la plateforme. Ce résultat est en accord avec les données concernant le récepteur sauvage, sauf qu'ici il s'agit d'une chimioattraction vers le sérum et que les cellules ne répondent pas au SCF. La vitesse de migration des cellules déficientes semble aussi inférieure *in vivo* puisqu'elles atteignent les organes lymphoïdes moins rapidement que les cellules normales. Ceci suggère que les tyrosines interviennent dans des voies de synergie facilitant la migration ou que les cellules ont modifiées leur capacité migratoire intrinsèque. Ce résultat est appuyé par la modification du profil transcriptionnel de nombreux gènes impliqués dans la migration observée dans l'analyse du transcriptome. Il semblerait que la perte des tyrosines conduise à une reprogrammation stable mais réversible (dépendante de l'activité du récepteur) de plusieurs constituants cellulaires impliqués dans cette fonction. Les intégrines concernées semblent impliquées dans une adhésion spécifique au fibrinogène. Malgré des tentatives répétées, nous n'avons pas observé de différence d'adhésion sur cette matrice *in vitro*.

### **b- Dans les souris nude**

Nous avons pu monter *in vitro* que la mutation du site dityrosine juxtamembranaire affecte à la fois les propriétés proliférative et migratoire des cellules transformées par KIT-D816. *In vivo*, les souris ayant reçues les cellules mutées sur la plateforme dityrosine décèdent plus rapidement. La différence de cinétique observée *in vivo* pourrait provenir de l'une ou l'autre des modifications des propriétés cellulaires ainsi que d'autres modifications fonctionnelles non testées.

Nous avons pu mettre en évidence que le défaut de migration observé *in vitro* se traduit *in vivo* par une localisation retardée des cellules FF-D816V dans les organes lymphoïdes. Des études à des temps cinétiques plus éloignées pourraient permettre de savoir si ce retard est ensuite rattrapé comme semblent le suggérer les données issues de l'analyse des souris 24 heures post-injection. Cependant des expériences à des temps plus longs sont très difficiles à envisager dans la mesure où les observations refléteraient un équilibre entre la prolifération et la migration des différentes cellules. Comme les données *in vitro* suggèrent des différences des cellules dans leur capacité à proliférer sous forme de colonies, la dissociation des fonctions de prolifération et de migration est impossible sans analyses plus poussées. Un suivi des cellules en prolifération par marquage à la bromodéoxyuridine (BrdU) pourrait renseigner sur la capacité proliférative des cellules injectées.

De manière inattendue, nous avons observée 24h post-injection une localisation exclusive des cellules mutées dans le foie alors qu'aucune différence n'était visible 3h après l'injection. Dans l'éventualité d'une prolifération dans ce compartiment, cette localisation différentielle pourrait être à l'origine d'une défaillance hépatique aggravant la pathologie des souris. Des métastases hépatiques ont régulièrement été observées au sacrifice des différents animaux mais aucune discrimination notable n'avait été observée, suggérant qu'il puisse s'agir d'un problème de cinétique (à la fois migratoire et prolifératif) plutôt que d'un envahissement sélectif.

### **2-C-3- Conclusion générale et Discussion**

Le domaine juxtamembranaire de KIT est impliqué dans un mécanisme d'auto-contrôle de l'activité de la kinase<sup>108 107</sup>. Des mutations dans ce domaine peuvent être à l'origine de l'activation constitutive du récepteur. Ces mutations situées dans l'exon 11 sont impliquées dans 60 à 70% des cas de GIST<sup>352 345</sup>. Le domaine JM fonctionne comme un inhibiteur conformationnel lorsque la kinase est sous forme inactive. Il présente une structure en épingle repliée à l'intérieur de la fente catalytique et inhibe la kinase en stabilisant la forme inactive et en empêchant le recrutement des substrats. Les tyrosines 568 et 570 sont localisées dans ce

domaine. La mutation du site pourrait donc entraîner une modification structurale et conformationnelle du domaine JM affectant la régulation de l'activité catalytique de la kinase. Ce mécanisme pourrait rendre compte à lui seul de l'augmentation du pouvoir transformant lié à l'expression du mutant YY568-570FF.

Cependant, la délétion du site a été étudiée dans le contexte du récepteur activé KIT<sup>D816</sup>. La mutation 816 est à elle seule responsable d'une modification conformationnelle majeure de la kinase qui est bloquée dans un état activé. Elle est d'ailleurs insensible aux inhibiteurs de kinases ciblant les conformations inactives tels que le STI571<sup>392</sup>. Dans cet état, le domaine JM n'a plus de rôle inhibiteur. Il est donc peu vraisemblable que des mutations supplémentaires affectent l'auto-régulation négative de l'activité kinase du récepteur. Cependant cette hypothèse ne peut être exclue. En pratique, nous n'avons pas observé de différence de niveau de phosphorylation du récepteur qu'il soit ou non muté sur le site dityrosine.

Lorsqu'elles sont injectées dans des souris *nude*, les cellules Ba/F3 transformées par l'oncogène KIT-D816V déficientes pour le motif dityrosine juxtamembranaire Y568-Y570 sont plus agressives que les cellules normales dans l'induction d'une leucémie chez l'animal. On peut donc dire que dans le contexte du développement pathologique, la résultante du signal émanant normalement du motif dityrosine est un signal négatif sur la transformation cellulaire dont la perte aggrave la pathologie des animaux. Cette observation globale doit en réalité correspondre à un état d'équilibre résultant d'un ensemble de modifications comportementales et fonctionnelles des cellules mutées sur la plateforme. Les analyses cellulaires conduites *in vitro* révèlent en effet au moins deux différences entre les cellules mutées et non mutées sur le motif dityrosine quant à leur capacité proliférative et migratoire. D'autre part les analyses transcriptionnelles et de signalisation confirment que les cellules exprimant KIT-D816V et KIT-YY568-570FF-D816V sont différentes à bien des égards.

Si des modifications « autonomes cellulaires » pourraient expliquer les différences observées, la contribution de l'environnement tumoral ne peut pas être exclue dans la participation à une aggravation de la pathologie leucémique chez les animaux. On pourrait par exemple envisager que le motif dityrosine soit impliqué dans les voies de signalisation intracellulaire enclenchées en réponse à une attaque

du système immunitaire anti-tumoral (dont les souris *nude* ne sont pas totalement dépourvues !).

De manière générale, on peut se demander dans quelle mesure les effets observés *in vitro* peuvent être reliés aux effets observés *in vivo*. Il est clair que la signalisation de KIT agit en synergie avec d'autres récepteurs comme décrit pour ... (*confer* paragraphe XX). Une étude de Tan *et al* suggère par ailleurs l'implication du motif dityrosine dans la synergie avec EpoR<sup>179</sup>. Il semble donc que la transposition d'effets observés *in vitro* aux conséquences observées *in vivo*, c'est-à-dire dans le contexte d'une activation de la cellule par de multiples facteurs de croissance, chimiokines et interleukine et dans le contexte d'une réponse immunitaire compétente soit loin d'être triviale et élucidée. De plus amples investigations sont donc nécessaires pour répondre à cette question.

Les interacteurs décrits sur la plateforme dityrosine peuvent être classés en régulateurs positifs (effecteurs yin) et négatifs (effecteurs yang) de la transformation cellulaire vue dans son ensemble, c'est-à-dire sans distinguer les propriétés caractéristiques de Weinberg. Etant donné le grand nombre de ces interacteurs il est difficile d'attribuer les effets observés à l'une ou l'autre des voies mais plutôt comme la conséquence globale de l'altération de l'équilibre dynamique de la signalisation initiée sur le site. Par ailleurs il est vraisemblable que le rôle des voies soit différent en fonction de la fonction regardée.

Nous avons séquencé une biopsie provenant d'une tumeur gastro-intestinale (GIST) d'un patient qui contenait la substitution de la tyrosine 570 par une valine. Il serait intéressant de relier cette mutation au phénotype de la pathologie pour connaître la valeur pronostique éventuelle de cette mutation.

Cette étude montre que le mutant 816 maintient une partie de ses régulations négatives. En effet des mutations additionnelles dans le motif di-tyrosine juxtamembranaire confèrent aux cellules une capacité transformante plus importante. Ainsi, des altérations additionnelles venant s'ajouter à la mutation D816 peuvent conduire à une modification du comportement des cellules transformées les rendant plus agressives.

Ceci suggère par ailleurs que l'utilisation d'inhibiteurs de certaines voies pourrait avoir des conséquences non souhaitées sur le pouvoir transformant des cellules portant la mutation 816.

Il est donc fondamental de comprendre les mécanismes et l'implication fonctionnelle de la signalisation oncogénique, que ce soit au niveau proximal ou au niveau distal, et ce à la fois dans l'initiation mais aussi dans le maintien des propriétés transformantes des cellules cancéreuses. Ces études permettront d'adapter les stratégies thérapeutiques de manière ciblée et raisonnée.

## **2-D- Matériel et Méthodes**

### **Antibodies and Reagents**

Antibodies used in this study, both for western blot or FACS analysis, are referenced in Table 1 (Supplementary data). Tyrosine kinase inhibitors Imatinib and Dasatinib were purchased from Sequoia Research (UK).

### **Cell Culture**

Cells used in this study are HMC-1.2 cells, a Human Mast Cell leukaemia cell line with the two point mutations V560G and D816V kindly provided by Dr J.H.Butterfield (Furitsu, 1993, J Clin Invest), Ba/F3 cells, an IL-3 dependent murine lymphoid cell line and EML cells, an immortalized lymphohematopoietic murine cell line. All cells were grown in 5% CO<sub>2</sub> at 37°C in RPMI 1640 medium supplemented with 10% heat-inactivated foetal bovine serum (FBS) and antibiotics (complete medium). Parental Ba/F3 and EML cells were grown with addition of 0,1% conditioned medium from X63-IL-3 cells as source of Il3 (Karasuyama, 1988, Eur J Immunol) and 250 ng/ml murine SCF respectively (Peprotech). All reactants are from Invitrogen (Carlsbad, CA).

### **Stable KIT expressing cell lines**

Tyrosines to phenylalanines mutations in hKit cDNA were obtained using QuickChange Site-directed Mutagenesis Kit (Stratagene) according to manufacturer's instructions. All mutations were confirmed by sequencing. Ba/F3 cells were transfected with the different c-kit constructs as described (Letard, 2008, Mol cancer Res). EML cells were transduced as described (Yang, 2010, Blood). Briefly, EML cells were transduced by using Phoenix<sup>TM</sup> retroviral expression system (ATCC, LGCStandards, France). Phoenix cells were first transfected with pLXSN vectors containing c-kit constructs using Fugene 6 (Roche Applied Science, Indianapolis) according to the manufacturer's instructions. 48 hours later, retroviral supernatants were used to infect EML cells. 24 hours after transfection, cells were selected with 0.4 mg/mL of geneticin (Invitrogen SARL, France) in corresponding culture medium for 14 days. Ba/F3 and EML cells transfected with KIT mutants were further grown in growth factor-free medium in order to obtain autonomous populations.

### **Biochemical procedures**

Prior to **lysis**, cells were starved for 3 hours in RPMI-0,5%FBS in presence for the last hour of kinase inhibitor when mentioned. Cells were rinsed twice in cold PBS, and lysed for 1 h at 4°C in "HNTG" lysis buffer: Hepes 50mM pH7,5, EGTA 1mM, Triton X-100 1%, Glycerol 10%, NaCl 150mM, MgCl<sub>2</sub> 1,5mM, NaF 0,2%, orthovanadate 1mM and protease inhibitors (Complete Tablets, Roche). Triton-soluble proteins were recovered in the supernatant of a 30 min centrifugation at 13 000 × g and 4 °C and protein concentration was determined with the Bio-rad Protein Assay.

**Immunoprecipitations and Western-blotting** were done as previously described (Bayle, 2004, JBC). Proteins were separated by SDS-PAGE and transferred to PVDF Immobilon-P membrane (Millipore). Membranes were incubated with primary antibodies and horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies (anti-rabbit, mouse or goat all from CST). Proteins were visualized by incubation with Supersignal West-Pico Chemiluminescent reagent (Pierce, Rockford, IL).

### **Peptide pull-down assays and mass spectrometry analysis**

Peptides corresponding to amino-acid 563 to 577 of human KIT (NH<sub>2</sub>-INGNNYVYIDPTQLP-COOH) were synthesized in four different forms (Eurogentec, Belgium). The “control” form contains the two tyrosines 568 and 570 in a non phosphorylated state (Y568-Y570) and three different “active” forms contain either the phosphotyrosine 568 (pY568) or the phosphotyrosine 570 (pY570) or both (pY568-pY570). Peptides were cross-linked to NHS-activated Sepharose 4 Fast Flow beads (GE Healthcare) in a ratio of 10 nmol of peptides for 10 µL of beads. Pull-down experiments were performed with a ratio lysate/coupled-beads of 50mg/20µl for mass spectrometry identification and 1mg/1µL for validation in western blot. For mass spectrometry analyses, protein complexes were separated in a Xcell sure lock™ electrophoresis unit with 4–12% bis–tris gradient pre-cast NuPAGE™ gels in MOPS buffer according to the manufacturer’s instructions (Invitrogen). Silver stained samples were prepared and digested according to Shevchenko et al (Shevchenko, 1996, Anal Chem.). Mass spectrometry analyses were performed using MALDI-TOF by Ultraflex Bruker instrument (Bruker Daltonique). Protein identification was carried out with Mascot software (Matrixscience Inc.).

### **Liquid Proliferation Assays**

A total of 10<sup>4</sup> cells per well were seeded into 96-well plates in 100µl of complete medium in presence or absence of TK inhibitors, or in medium containing variable concentrations of FBS and glucose as indicated. Medium containing varying concentration of glucose was prepared from glucose-free RPMI (Invitrogen). Kinetics analysis of viable cell counts were carried out using the CellTiter-Glo luminescent cell viability assay using the manufacturer’s instructions (Promega).

### **Adhesion to fibronectin**

Adhesion assays were performed as previously described (Voisset, 2010, BBRC). Ninety-six-well plates were incubated overnight at 4°C with PBS containing 20 µg/ml of fibronectine (Chemicon International). The coating solution was removed by aspiration, replaced with HBSS containing 5% BSA and incubated for 1 h at 37°C. The plates were then washed three times with cell adhesion medium (HBSS containing 0.5% BSA). Cells starved 3 hours in RPMI containing 0.5% FBS were harvested, washed and resuspended in cell adhesion medium. Cells (6.10<sup>4</sup>) were plated in 100 µl of cell adhesion medium in triplicate onto the fibronectin-coated wells. Plates were incubated at 37°C for indicated time. After washing, cell adhesion was then quantified using CellTiter-Glo according to the manufacturer’s recommendations (Promega). Results are expressed as percentage of adherent cells where 100% corresponds to 6.10<sup>4</sup> cells.

### **Chemotaxis assay**

In vitro migration assays were done using modified Boyden chambers in 96-well plates with 5 µm pore inserts (CORNING BV). Cells were starved in RPMI containing 0.5% BSA for 1h30, with or without kinase inhibitor during the last 30 minutes, then 1.10<sup>5</sup> cells were plated in the upper chamber and allow to migrate towards the lower chamber containing RPMI-10%FCS. The number of cells in the lower chamber was evaluated after 6 h incubation at 37°C using CellTiter-Glo according to the

manufacturer's recommendations (Promega). Results are expressed as percentage of migrating cells where 100% corresponds to  $10^5$  cells. Average cell number and standard deviation to the mean were calculated from quadruplet wells.

### **Colony formation in semisolid medium**

Ba/F3 mutant cells were washed two times with IMDM and mixed with methylcellulose hematopoietic colony assay medium (MethoCult M3231, Stem Cell Technologies) at the concentration of 10,000 cells/ml, and incubated at 37 °C in a humidified atmosphere for 7-10 days. Colony images were captured under binocular (magnification 1,6) or inverted microscopy (magnification 40) and counted on day 10.

### **Survival assays in nude mice**

Prior to injection into mice, cells were washed twice in NaCl and resuspended at 1 million cells/mL in NaCl. Nude mice (purchased from Charles River Laboratories, Raleigh, NC, USA) were kept under standard conditions in the CRCM animal care facility. A total of 105 Ba/F3 cells (100  $\mu$ L) were injected into the retro-orbital sinus of 8- to 10-week-old female mice under isofluran anesthesia using 27-gauge needles. Injected mice were housed in microisolator cages with close observation to detect signs and symptoms of disease. Mice were monitored for signs of weakness, weight loss, and morbidity. Ill-appearing mice were sacrificed.

### **In vivo homing assay**

Ba/F3-KIT<sup>D816V</sup> cells and Ba/F3-KIT<sup>D816V</sup>-YY<sub>568-570</sub>FF were labeled separately with PKH67 green and PKH26 red-fluorescent linker kit (SIGMA) according to manufacturer's protocol. Cells were mixed in 1:1 ratio and injected into mice (10 million cells / 200  $\mu$ L NaCl per mice). Each series contain 5 injected mice and a control (NaCl-only injected mouse). A first series of animals were sacrificed 3h later and second series 24h later. For each mouse, single cells from the bone marrow (one femur), 1g of liver, 2 lobes of lung and the entire spleen were isolated by passing through a 70- $\mu$ m nylon mesh and suspended in PBS-EDTA 1,25mM-5%FBS. All preparations were clarified of red blood cells by red cell lysis (ACK lysing Buffer, Invitrogen). Organs cell suspensions were prepared in the same volume for the two time points and the same numbers of cells were analyzed allowing qualitative comparison of cell number. Cells in each organ were analyzed for expression of green and red fluorescence by FACS on a BDLSRII SORP FACSaria flow cytometer (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) Experiment was performed twice.

### **Gene expression profiling and analysis**

Gene expression profiling was done as previously described (Yang, 2010, Blood, supplementary material and methods). Expression data were analyzed by the Robust Multichip Average method in R using Bioconductor and associated packages. Filtered and log<sub>2</sub>-transformed data were analyzed by hierarchical clustering using the Cluster program. Results were displayed using TreeView. Gene ontology analysis was performed using either Ingenuity or ErmineJ.

### **Membrane Staining and Flow cytometry Analysis**

Pretreated or not with dasatinib (10nM for 16 hours) cells were starved for 3 hours and rinsed in PBS. Each membrane staining was performed for 30 min at 4°C on  $10^5$  cells in 100  $\mu$ L of PBS-EDTA 1,25mM containing indicated fluorochrome-coupled antibody. Cells were analyzed on a BDLSRII SORP FACSaria flow cytometer

(Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) using FloJo software. Cell labeling was repeated trice independently on two independently derived Ba/F3 mutant cells.

**Table 1: Antibodies**

**Western-Blotting**

Total proteins	Reference	Phosphorylated Proteins	Reference
AKT	CST-9272	AKT-pS473	CST-9271
CRKL	Sc-319		
ERK1/2	Sc-154	ERK1/2-pT202/Y204	Promega V803A
FES	Calbiochem OP02		
FYN	Sc-28791		
GAB2	Sc-25498		
GRB2	Sc-225		
GSK3-β	CST-9315	GSK3β-pS9	CST-9336
JNK	BD-610628	JNK-pT183/185	CST-9251
KIT	Sc-13508		
KIT	CST-3074	KIT-pY719	CST-3391
LNK	From L.Velazquez		
LYN	Sc-7274	LYN-pY396	Epitomics 1645-1
p38	CST-9212	p38-pT180/182	Promega V121A
p85	Upstate 06195		
PLCγ1	Sc-81		
PLCγ2	Sc-407		
PTEN	CST-9559	PTEN-pS380	CST-9551
S6	CST-2217	S6-pS235/236	CST-2211
SHC	BD-610879		
SHIP-1	CST-2728	SHIP-1-pY1020	CST-3941
SHIP-1/2	Sc-6244		
SHP-1	BD-610125		
SHP-2	BD-610621		
SRC		SRC-pY416	CST-2101
STAT1	Sc-346	STAT1-pY701	CST-9171
STAT3	Sc-482	STAT3-pY705	CST-9131
STAT5	Sc-835	STAT5-pY694	CST-9351
SYK	CST-2712	SYK-pY352	CST-2715
SYK	Sc-1077		

CST : Cell Signaling Technology - Sc : Santa Cruz - BD Biosciences

**FACS**

	Clone Number
CD11A	2D7
CD11B	M1/70
CD11C	HL3
mCD117	2B8
hCD117	104D2



Conclusion générale et Discussion :  
Les RTK oncogéniques, des cibles thérapeutiques ?

## Conclusion générale et discussion : Les RTK oncogéniques, des cibles thérapeutiques ?

La transformation cellulaire résulte en partie de l'altération de la fonction de certains proto-oncogènes assez spécifiques en fonction du type de cancers considérés. La réparation ou l'inactivation d'un oncogène défini dans un cancer donné pourrait donc conduire à la réversion du processus de tumorigenèse. Cependant le cancer résulte souvent d'une succession d'altérations génétiques qui ont lieu en plusieurs étapes <sup>495</sup>. A priori, de l'inactivation d'un seul oncogène on pourrait donc s'attendre à plusieurs conséquences possibles allant de l'absence d'effet à une régression partielle ou totale des néoplasies.

### **On sait aujourd'hui que la tumorigenèse est un processus en partie réversible.**

Deux grands types d'exemples illustrent que l'inactivation d'un oncogène peut dans certains cas être suffisante à la réversion cancéreuse.

Des études menées dans des **modèles animaux** ont révélé que l'oncogénèse induite par un oncogène spécifique peut être reversée lorsque que celui-ci est inactivé.

*Pour des revues sur les souris transgéniques utilisées comme modèles de cancérogenèse et sur leur utilisation dans des phases d'essais pré-cliniques, consulter les références <sup>496 497</sup>.*

De nombreux résultats ont été obtenus dans des modèles de souris exprimant des oncogènes de manière conditionnelle. On peut citer :

La formation réversible des métastases pulmonaires liées à l'expression conditionnelle de l'oncogène *Neu* dans l'épithélium mammaire <sup>498</sup>.

La réversion des adénocarcinomes mammaires et des métastases pulmonaires Wnt-dépendants suite à son inactivation <sup>499</sup>.

La rémission complète de la leucémie après suppression de l'expression de BCR-ABL1 <sup>500</sup>.

La régression des adénocarcinomes du poumon dirigés par l'expression d'un allèle oncogénique de *k-ras*<sup>501</sup>.

De nombreuses études ont montré la réversion possible de l'oncogénèse dépendante de l'activation du proto-oncogène *c-myc* dans des hémopathies et des tumeurs solides. On peut citer :

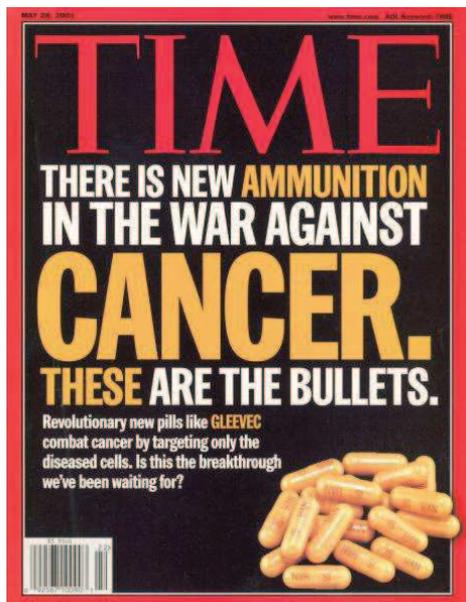
La réversion de la leucémie induite après inactivation de l'oncogène *MYC* dans le compartiment hématopoïétique<sup>502</sup>.

Une inactivation brève suffisante à la régression des sarcomes ostéogéniques<sup>503</sup> et des carcinomes hépatocellulaires<sup>504</sup>.

De manière générale, ces études ont révélé que la conséquence de l'inactivation oncogénique est variable en fonction des tumeurs et du contexte cellulaire et génétique. Tout d'abord les modalités de la régression sont variables (différenciation, apoptose/sénescence). En effet dans certains cas on induit un arrêt de prolifération par induction de la sénescence ou de la mort cellulaire programmée par apoptose. Dans d'autres cas, ce phénomène est précédé d'une reprise de la différenciation, suivie d'une induction de la sénescence et /ou de l'apoptose. Ensuite, l'inactivation transitoire de l'oncogène peut être parfois suffisante pour éradiquer le cancer, mais d'autres fois non et il peut exister une réactivation des tumeurs dormantes. *Pour un article de revue illustrant ces principes, consulter la référence*<sup>505</sup>.

Puis le **succès thérapeutique du Gleevec chez l'homme** a démontré que, au moins dans certains types de tumeurs, l'inactivation oncogénique était suffisante pour faire régresser voire éradiquer la maladie.

L'imatinib, ou STI-571 est le prototype des inhibiteurs sélectifs de tyrosine kinase. *In vitro*, Druker et al ont montré sa capacité à inhiber la croissance de cellules transformées par l'oncogène *BCR-Abl*. Dans des tests de formation de colonies à partir de cellules de moelle osseuse issues de patients atteints de CML, le STI réduit le nombre de colonies *BCR-Abl* positives de 92% à 98% sans affecter la croissance des colonies normales<sup>506</sup>.



Approuvé par la FDA en 2001 pour le traitement des LMC (environ 95% des LMC dépendent de BCR-Abl), l'imatinib, commercialisé sous le nom de Gleevec est décrit comme « **the magic bullet to cure cancer** » par le magazine TIME.

Comme c'est aussi un inhibiteur des mutants de type régulateurs de KIT<sup>507</sup>, il est utilisé aujourd'hui dans le traitement des GIST<sup>508 509</sup> et de certaines mastocytoses, où il s'est révélé très efficace<sup>510</sup>. Avec l'avènement du traitement à l'imatinib, le pronostic des patients atteints de GISTs s'est notablement amélioré avec un taux de réponse initial de 85 à 90%. Les patients portant des mutations dans l'exon 11 sont les meilleurs répondeurs, un peu moins pour les mutations dans l'exon 9 alors que les patients ne possédant pas de mutations dans KIT (ou PDGFR) sont insensibles au traitement<sup>120</sup>.

Le mutant D816 étant résistant à l'imatinib<sup>511 512</sup>, l'utilisation d'autres ITKs comme par exemple le Dasatinib, auquel le mutant 816 est sensible<sup>393</sup>, sont actuellement en essai clinique<sup>513</sup>.

D'autres thérapeutiques anti-cancéreuses ciblées ont ensuite été développées. C'est le cas par exemple des thérapies à l'aide d'anticorps monoclonaux bloquants (mAb). Le Trastuzumab par exemple est un anticorps dirigé contre EGFR2 (HER2) qui s'est révélé très efficace dans le traitement des cancers du sein HER2-dépendants<sup>514</sup>.

Ainsi le développement des thérapeutiques ciblées sur les kinases oncogéniques a permis d'améliorer de manière remarquable le pronostic des patients atteints de cancers spécifiques. Les recherches visant à améliorer les thérapeutiques ciblées existantes (inhibiteurs sélectifs de tyrosine kinase (ITKs) et anticorps monoclonaux bloquants (mAb)) se poursuivent tandis que les recherches visant à valider et développer de nouvelles cibles et médicaments sont en plein essors.

### **Du succès à l'échec des thérapies ciblées....Dark side of the force**

Avec le recul sur les patients atteints de GIST traités avec le Gleevec, il est apparu que certains patients avaient développé des résistances à long terme, correspondant sur le plan moléculaire à l'acquisition dans KIT de mutations secondaires<sup>515</sup>. Certaines de ces mutations empêchent par exemple la fixation de l'inhibiteur et protègent donc l'activité kinase de l'oncogène<sup>516</sup>.

Le développement de résistances secondaires semble une évolution inévitable des traitements ciblés que ce soit avec les ITKs<sup>517</sup> ou avec les mAb<sup>518</sup>,<sup>519</sup>. Analysées du point de vue de la biologie systématique, ces résistances sont une conséquence de l'adaptabilité et de la plasticité du système de communication intracellulaire, deux propriétés qui, comme décrit précédemment, découlent de sa robustesse (confer paragraphe 3E).

Cette perspective d'analyse révèle que, si le système est initialement vulnérable à une perturbation non conventionnelle, il est capable d'évoluer et de s'adapter et devient alors beaucoup plus résistant aux attaques ultérieures.

La solution proposée par la biologie systémique est une approche combinée utilisant plusieurs thérapies, ciblées sur des points précis identifiés comme des points de fragilité du réseau capables de faire s'effondrer le système en cas d'attaque simultanée. L'attaque de plusieurs noeuds à la fois est une solution évitant le développement de résistances dont la probabilité d'être multiples est beaucoup plus faible.

*Pour une excellente revue sur le sujet, consulter la référence<sup>304</sup>.*

Ces études travaillent à l'identification de ces points critiques qui de part l'étude à l'échelle des systèmes pourraient apparaître comme des propriétés émergentes invisibles à une échelle inférieure d'analyse. Par exemple, une étude récente a montré que de simples variations quantitatives du taux d'expression de certaines protéines du réseau de signalisation intracellulaire pouvaient à elles seules conduire à une reprogrammation de certains circuits de signalisation <sup>520</sup>.

## **Les mécanismes et les modèles de la réversion oncogénique**

Les études dans les modèles animaux et chez l'homme ayant révélé la réversibilité du processus d'oncogenèse, un modèle théorique a été formulé pour rendre compte du phénomène. Il s'agit de la théorie de « l'addiction oncogénique » formulée par Weinstein <sup>421 521</sup>. Aujourd'hui ce modèle doit évoluer pour intégrer les nouvelles découvertes issues de la recherche sur le cancer. Le modèle théorique de Felsner de « l'amnésie oncogénique » est discuté <sup>522</sup>.

### **L'addiction oncogénique comme modèle**

Le mécanisme général de la réversion oncogénique a été initialement conceptualisé par Weinstein sous le terme d'**addiction oncogénique** <sup>421 521</sup>.

Dans ce modèle l'activité oncogénique est responsable de la reprogrammation ou de l'activation de nouvelles voies de signalisation intracellulaire qui s'opposent aux voies physiologiques tentant de stopper la prolifération et d'induire l'apoptose de la cellule transformée. La perte de l'oncogène conduit à l'arrêt de l'opposition à ces voies, et donc à l'apoptose des cellules et à la régression tumorale.

Ce modèle suggère l'apparition d'un nouvel état d'équilibre, différent de l'état physiologique, et permet d'expliquer que l'inactivation oncogénique conduit sélectivement à la mort des cellules transformées et pas à celle des cellules normales.

Ce modèle a initialement permis de formaliser intellectuellement l'observation de la réversibilité de la tumorigenèse. Dans le cas des RTK, quelques soient les

mécanismes responsables de la signalisation oncogénique et de la transformation, ils naissent de l'activation constitutive des kinases. Les cellules cancéreuses sont dépendantes (au moins au début) de cette activation pour leur survie. Inhiber l'activité oncogénique c'est tuer sélectivement les cellules cancéreuses.

Cependant, ce modèle a aujourd'hui atteint ses limites. D'abord, il n'explique pas vraiment les mécanismes responsables de la transformation. Ensuite, il ne peut rendre compte de plusieurs des nouvelles caractéristiques décrites des cellules cancéreuses. Il ne peut expliquer convenablement les conséquences variables de la suppression oncogénique dans différents types de tumeurs. Il n'adresse pas la question de l'auto-renouvellement des cellules cancéreuses (hypothèse des cellules souches cancéreuses<sup>523</sup>). Il ne prend pas en compte le rôle de l'environnement dans la régression tumorale ni le rôle des mécanismes par lesquels les oncogènes sont initialement contenus, empêchant dans un premier temps la progression tumorale. Un de ces mécanismes, la sénescence, est aujourd'hui reconnu comme un mécanisme suppresseur de tumeur. *Pour des articles de revue sur ce thème, consulter les références*<sup>524 525 526 527</sup>.

### **Un nouveau modèle possible : l'amnésie oncogénique**

#### **Doctor Jekyll and Mr Hyde model of cancer**

Récemment, Dean Felsher a proposé un nouveau modèle conceptuel permettant de rendre compte de l'addiction oncogénique et d'intégrer la plupart des nouvelles caractéristiques des cellules cancéreuses<sup>522</sup>.

Dans ce modèle, les oncogènes doivent être directement impliqués dans le contrôle de la balance entre auto-renouvellement et sénescence, ainsi que dans le contrôle de la différenciation et/ou de la réparation de l'ADN.

Ce modèle est présenté/explicité dans la suite de ce paragraphe.

L'activation oncogénique conduit à une prolifération incontrôlée ne répondant pas aux contrôles physiologiques et s'accompagne d'une instabilité génétique<sup>528</sup>.

Or, il existe des mécanismes d'auto protection cellulaire à l'échelle de l'ADN qui sont capables d'enrayer la transformation cellulaire en cas d'activation

oncogénique conduisant à un stress génomique <sup>529</sup>. Il est supposé que ces mécanismes « suppresseurs de tumeurs » doivent être éteints afin que la transformation cellulaire puisse avoir lieu. Ce modèle initialement décrit dans le cas du cancer colorectal est plus largement admis maintenant <sup>495</sup>.

Au cours de la transformation cellulaire, en plus de l'activation oncogénique, doivent donc intervenir des altérations génétiques ou épigénétiques capables de bloquer suffisamment des points de contrôles empêchant l'induction de programmes conduisant à la mort ou la sénescence cellulaire.

En levant la modification oncogénique génétique (par les inhibiteurs par exemple), il y a restauration d'un programme physiologique qui est identique à la réponse initiée par des dommages sur l'ADN. On peut en conclure que ces voies de contrôle n'ont pas été altérées génétiquement (ie définitivement) ou que les oncogènes sont directement impliqués dans leur contrôle (hypothèse de Felsner). Alors, dans la plupart des cas, l'inactivation oncogénique conduit à la prise de conscience par la cellule de ces dommages et ainsi à son arrêt de prolifération (sénescence ou mort). Dans l'exemple illustratif choisi par l'auteur, Dr Jekyll se rendant compte des aberrations provoquées par Mr Hyde peut choisir de se sacrifier. Il peut aussi apprendre et/ou évoluer, expliquant les phénomènes de rémission totale ou partielle.

La différence entre l'addiction oncogénique et l'amnésie oncogénique est que, dans le deuxième cas, la régression provient de la restauration des mécanismes physiologiques de surveillance de l'intégrité cellulaire.

Ce modèle suggère que les oncogènes bloquent certains des points de contrôles mais pas tous. Il suggère aussi que l'inactivation totale de l'oncogène n'est pas forcément requise pour réactiver ces mécanismes et que le simple retour à un niveau d'activation physiologique puisse être suffisant. Ces constatations sont supportées par des observations expérimentales présentées précédemment.

Ce modèle explique aussi que les cellules tumorales puissent avoir des réponses différentes à l'inactivation oncogénique en fonction de leur état génétique et épigénétique initial (sénescence, différenciation, ou mort).

En positionnant les oncogènes dans la balance entre auto renouvellement et sénescence, ce modèle permet d'intégrer la théorie des cellules souches cancéreuses.

Enfin il prévoit que les cellules transformées, ayant pris conscience de leur état suite à l'inactivation oncogénique, envoient les messages corrects à l'environnement qui réagit alors en conséquence en restaurant le microenvironnement normal, par exemple en inhibant la néoangiogenèse initiée au cours du développement tumoral<sup>530</sup> ou en recrutant le système immunitaire pour faciliter l'élimination des cellules cancéreuses<sup>531 532</sup>.

### **De l'intérêt d'étudier et de comprendre les mécanismes de l'oncogenèse**

Les thérapies ciblées se sont révélées formidablement efficaces dans le traitement de certains cancers et ont notablement amélioré le pronostic vital des patients. Le succès initial a conforté un positionnement moderne de l'industrie et de la recherche tendant à considérer moins les mécanismes que les effets.

Cependant, à l'heure actuelle, les thérapies ciblées, même quand elles ont initialement été efficaces, finissent toujours malheureusement par échouer à cause du développement de résistances secondaires aux traitements.

La recherche n'ayant pas vraiment expliqué les mécanismes de la régression tumorale suite à l'inactivation oncogénique, responsables du succès de la thérapie, les mécanismes coupables de l'échec successif restent obscurs.

Quelque soit le modèle qui décrive le mieux le devenir des cellules tumorales suite à l'inactivation oncogénique (ie addiction ou amnésie), il est nécessaire de décrypter les mécanismes responsables et de mieux comprendre comment l'activation oncogénique conduit et entretient la transformation cellulaire. Nous devons cibler spécifiquement les oncogènes mais devons comprendre quand et pourquoi le faire, afin de mieux rationaliser les traitements contre les différents cancers.

L'avenir des thérapies anti-cancéreuses réside donc dans la compréhension des mécanismes de la transformation cellulaire. Ceci à l'échelle moléculaire ou à l'échelle globale.

A l'échelle globale, l'approche par la biologie systémique permet de modéliser les réseaux de signalisation intracellulaire dans le but de comprendre leur fonctionnement et de prédire leurs points de fragilité. Cette approche permet par ailleurs d'intégrer les données issues des nombreuses techniques de criblage à haut débit (les techniques « omes ») utilisées aujourd'hui.

Sur le plan moléculaire, il est nécessaire de décrire finement les mécanismes associés à la transformation initiée par différents oncogènes afin de mettre en évidence les potentielles similitudes ou différences qui permettront l'optimisation raisonnée des stratégies thérapeutiques.

Le travail réalisé au cours de cette thèse s'inscrit dans cette démarche. Nous avons apporté de nouvelles données sur les mécanismes moléculaires de la signalisation oncogénique de l'oncogène KIT-D816, tant au niveau proximal qu'au niveau distal sur l'une des voies de signalisation intracellulaire spécifiquement activé en aval, apportant notre pierre à l'édifice.

## Références Bibliographiques

## Références bibliographiques

1. Rokas, A. The origins of multicellularity and the early history of the genetic toolkit for animal development. *Annu Rev Genet* **42**, 235-51 (2008).
2. Gerhart, J. 1998 Warkany lecture: signaling pathways in development. *Teratology* **60**, 226-39 (1999).
3. Yarden, Y. et al. Human proto-oncogene c-kit: a new cell surface receptor tyrosine kinase for an unidentified ligand. *Embo J* **6**, 3341-51 (1987).
4. Besmer, P. et al. A new acute transforming feline retrovirus and relationship of its oncogene v-kit with the protein kinase gene family. *Nature* **320**, 415-21 (1986).
5. Chabot, B., Stephenson, D.A., Chapman, V.M., Besmer, P. & Bernstein, A. The proto-oncogene c-kit encoding a transmembrane tyrosine kinase receptor maps to the mouse *W* locus. *Nature* **335**, 88-9 (1988).
6. Geissler, E.N., Ryan, M.A. & Housman, D.E. The dominant-white spotting (*W*) locus of the mouse encodes the c-kit proto-oncogene. *Cell* **55**, 185-92 (1988).
7. Williams, D.E. et al. Identification of a ligand for the c-kit proto-oncogene. *Cell* **63**, 167-74 (1990).
8. Copeland, N.G. et al. Mast cell growth factor maps near the steel locus on mouse chromosome 10 and is deleted in a number of steel alleles. *Cell* **63**, 175-83 (1990).
9. Russell, E.S. Hereditary anemias of the mouse: a review for geneticists. *Adv Genet* **20**, 357-459 (1979).
10. Besmer, P. et al. The kit-ligand (steel factor) and its receptor c-kit/*W*: pleiotropic roles in gametogenesis and melanogenesis. *Dev Suppl*, 125-37 (1993).
11. Reith, A.D. et al. *W* mutant mice with mild or severe developmental defects contain distinct point mutations in the kinase domain of the c-kit receptor. *Genes Dev* **4**, 390-400 (1990).
12. Lev, S., Blechman, J.M., Givol, D. & Yarden, Y. Steel factor and c-kit protooncogene: genetic lessons in signal transduction. *Crit Rev Oncog* **5**, 141-68 (1994).
13. Galli, S.J., Zsebo, K.M. & Geissler, E.N. The kit ligand, stem cell factor. *Adv Immunol* **55**, 1-96 (1994).
14. Orr-Urtreger, A. et al. Developmental expression of c-kit, a proto-oncogene encoded by the *W* locus. *Development* **109**, 911-23 (1990).
15. Matsui, Y., Zsebo, K.M. & Hogan, B.L. Embryonic expression of a haematopoietic growth factor encoded by the *Sl* locus and the ligand for c-kit. *Nature* **347**, 667-9 (1990).
16. Keshet, E. et al. Embryonic RNA expression patterns of the c-kit receptor and its cognate ligand suggest multiple functional roles in mouse development. *Embo J* **10**, 2425-35 (1991).
17. Wolf, N.S. Dissecting the hematopoietic microenvironment. III. Evidence for a positive short range stimulus for cellular proliferation. *Cell Tissue Kinet* **11**, 335-45 (1978).
18. Broudy, V.C. Stem cell factor and hematopoiesis. *Blood* **90**, 1345-64 (1997).

19. Munugalavadla, V. & Kapur, R. Role of c-Kit and erythropoietin receptor in erythropoiesis. *Crit Rev Oncol Hematol* **54**, 63-75 (2005).
20. von Lindern, M., Schmidt, U. & Beug, H. Control of erythropoiesis by erythropoietin and stem cell factor: a novel role for Bruton's tyrosine kinase. *Cell Cycle* **3**, 876-9 (2004).
21. Ogawa, M. et al. Expression and function of c-Kit in fetal hemopoietic progenitor cells: transition from the early c-Kit-independent to the late c-Kit-dependent wave of hemopoiesis in the murine embryo. *Development* **117**, 1089-98 (1993).
22. Miller, C.L., Rebel, V.I., Helgason, C.D., Lansdorp, P.M. & Eaves, C.J. Impaired steel factor responsiveness differentially affects the detection and long-term maintenance of fetal liver hematopoietic stem cells in vivo. *Blood* **89**, 1214-23 (1997).
23. Bowie, M.B., Kent, D.G., Copley, M.R. & Eaves, C.J. Steel factor responsiveness regulates the high self-renewal phenotype of fetal hematopoietic stem cells. *Blood* **109**, 5043-8 (2007).
24. Young, H.M. Embryological origin of interstitial cells of Cajal. *Microsc Res Tech* **47**, 303-8 (1999).
25. Cable, J., Jackson, I.J. & Steel, K.P. Mutations at the W locus affect survival of neural crest-derived melanocytes in the mouse. *Mech Dev* **50**, 139-50 (1995).
26. Mackenzie, M.A., Jordan, S.A., Budd, P.S. & Jackson, I.J. Activation of the receptor tyrosine kinase Kit is required for the proliferation of melanoblasts in the mouse embryo. *Dev Biol* **192**, 99-107 (1997).
27. Nishikawa, S. et al. In utero manipulation of coat color formation by a monoclonal anti-c-kit antibody: two distinct waves of c-kit-dependency during melanocyte development. *Embo J* **10**, 2111-8 (1991).
28. Jordan, S.A. & Jackson, I.J. MGF (KIT ligand) is a chemokinetic factor for melanoblast migration into hair follicles. *Dev Biol* **225**, 424-36 (2000).
29. Sette, C., Dolci, S., Geremia, R. & Rossi, P. The role of stem cell factor and of alternative c-kit gene products in the establishment, maintenance and function of germ cells. *Int J Dev Biol* **44**, 599-608 (2000).
30. Ward, S.M. & Sanders, K.M. Physiology and pathophysiology of the interstitial cell of Cajal: from bench to bedside. I. Functional development and plasticity of interstitial cells of Cajal networks. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **281**, G602-11 (2001).
31. Tallini, Y.N. et al. c-kit expression identifies cardiovascular precursors in the neonatal heart. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 1808-13 (2009).
32. Miyamoto, S. et al. Characterization of long-term cultured c-kit<sup>+</sup> cardiac stem cells derived from adult rat hearts. *Stem Cells Dev* **19**, 105-16.
33. Torihashi, S. et al. c-kit-dependent development of interstitial cells and electrical activity in the murine gastrointestinal tract. *Cell Tissue Res* **280**, 97-111 (1995).
34. Okura, M., Maeda, H., Nishikawa, S. & Mizoguchi, M. Effects of monoclonal anti-c-kit antibody (ACK2) on melanocytes in newborn mice. *J Invest Dermatol* **105**, 322-8 (1995).
35. Grichnik, J.M., Burch, J.A., Burchette, J. & Shea, C.R. The SCF/KIT pathway plays a critical role in the control of normal human melanocyte homeostasis. *J Invest Dermatol* **111**, 233-8 (1998).

36. Hachiya, A., Kobayashi, A., Ohuchi, A., Takema, Y. & Imokawa, G. The paracrine role of stem cell factor/c-kit signaling in the activation of human melanocytes in ultraviolet-B-induced pigmentation. *J Invest Dermatol* **116**, 578-86 (2001).
37. Hachiya, A. et al. Biphasic expression of two paracrine melanogenic cytokines, stem cell factor and endothelin-1, in ultraviolet B-induced human melanogenesis. *Am J Pathol* **165**, 2099-109 (2004).
38. Hachiya, A. et al. Stem cell factor-KIT signalling plays a pivotal role in regulating pigmentation in mammalian hair. *J Pathol* **218**, 30-9 (2009).
39. Manova, K., Nocka, K., Besmer, P. & Bachvarova, R.F. Gonadal expression of c-kit encoded at the W locus of the mouse. *Development* **110**, 1057-69 (1990).
40. Dym, M. et al. Expression of c-kit receptor and its autophosphorylation in immature rat type A spermatogonia. *Biol Reprod* **52**, 8-19 (1995).
41. Sandlow, J.I., Feng, H.L., Cohen, M.B. & Sandra, A. Expression of c-KIT and its ligand, stem cell factor, in normal and subfertile human testicular tissue. *J Androl* **17**, 403-8 (1996).
42. Hakovirta, H. et al. Function of stem cell factor as a survival factor of spermatogonia and localization of messenger ribonucleic acid in the rat seminiferous epithelium. *Endocrinology* **140**, 1492-8 (1999).
43. Mauduit, C., Hamamah, S. & Benahmed, M. Stem cell factor/c-kit system in spermatogenesis. *Hum Reprod Update* **5**, 535-45 (1999).
44. Ogawa, M. et al. Expression and function of c-kit in hemopoietic progenitor cells. *J Exp Med* **174**, 63-71 (1991).
45. Keller, J.R., Ortiz, M. & Ruscetti, F.W. Steel factor (c-kit ligand) promotes the survival of hematopoietic stem/progenitor cells in the absence of cell division. *Blood* **86**, 1757-64 (1995).
46. Thoren, L.A. et al. Kit regulates maintenance of quiescent hematopoietic stem cells. *J Immunol* **180**, 2045-53 (2008).
47. Kent, D. et al. Regulation of hematopoietic stem cells by the steel factor/KIT signaling pathway. *Clin Cancer Res* **14**, 1926-30 (2008).
48. Levesque, J.P., Haylock, D.N. & Simmons, P.J. Cytokine regulation of proliferation and cell adhesion are correlated events in human CD34+ hemopoietic progenitors. *Blood* **88**, 1168-76 (1996).
49. Levesque, J.P., Leavesley, D.I., Niutta, S., Vadas, M. & Simmons, P.J. Cytokines increase human hemopoietic cell adhesiveness by activation of very late antigen (VLA)-4 and VLA-5 integrins. *J Exp Med* **181**, 1805-15 (1995).
50. Mendez-Ferrer, S., Lucas, D., Battista, M. & Frenette, P.S. Haematopoietic stem cell release is regulated by circadian oscillations. *Nature* **452**, 442-7 (2008).
51. Nervi, B., Link, D.C. & DiPersio, J.F. Cytokines and hematopoietic stem cell mobilization. *J Cell Biochem* **99**, 690-705 (2006).
52. Ray, P., Krishnamoorthy, N., Oriss, T.B. & Ray, A. Signaling of c-kit in dendritic cells influences adaptive immunity. *Ann N Y Acad Sci* **1183**, 104-22.
53. Kitamura, Y., Go, S. & Hatanaka, K. Decrease of mast cells in W/Wv mice and their increase by bone marrow transplantation. *Blood* **52**, 447-52 (1978).
54. Kitamura, Y. & Go, S. Decreased production of mast cells in S1/S1d anemic mice. *Blood* **53**, 492-7 (1979).
55. Malbec, O. & Daron, M. The mast cell IgG receptors and their roles in tissue inflammation. *Immunol Rev* **217**, 206-21 (2007).

56. Da Silva, C.A., Reber, L. & Frossard, N. Stem cell factor expression, mast cells and inflammation in asthma. *Fundam Clin Pharmacol* **20**, 21-39 (2006).
57. Reber, L., Da Silva, C.A. & Frossard, N. Stem cell factor and its receptor c-Kit as targets for inflammatory diseases. *Eur J Pharmacol* **533**, 327-40 (2006).
58. Yee, N.S., Paek, I. & Besmer, P. Role of kit-ligand in proliferation and suppression of apoptosis in mast cells: basis for radiosensitivity of white spotting and steel mutant mice. *J Exp Med* **179**, 1777-87 (1994).
59. Finotto, S., Mekori, Y.A. & Metcalfe, D.D. Glucocorticoids decrease tissue mast cell number by reducing the production of the c-kit ligand, stem cell factor, by resident cells: in vitro and in vivo evidence in murine systems. *J Clin Invest* **99**, 1721-8 (1997).
60. Kanbe, N. et al. Nerve growth factor prevents apoptosis of cord blood-derived human cultured mast cells synergistically with stem cell factor. *Clin Exp Allergy* **30**, 1113-20 (2000).
61. Gebhardt, T. et al. Cultured human intestinal mast cells express functional IL-3 receptors and respond to IL-3 by enhancing growth and IgE receptor-dependent mediator release. *Eur J Immunol* **32**, 2308-16 (2002).
62. Valent, P. et al. Induction of differentiation of human mast cells from bone marrow and peripheral blood mononuclear cells by recombinant human stem cell factor/kit-ligand in long-term culture. *Blood* **80**, 2237-45 (1992).
63. Kirshenbaum, A.S. et al. Effect of IL-3 and stem cell factor on the appearance of human basophils and mast cells from CD34+ pluripotent progenitor cells. *J Immunol* **148**, 772-7 (1992).
64. Moriyama, Y. et al. Role of aspartic acid 814 in the function and expression of c-kit receptor tyrosine kinase. *J Biol Chem* **271**, 3347-50 (1996).
65. Durand, B. et al. Long-term generation of human mast cells in serum-free cultures of CD34+ cord blood cells stimulated with stem cell factor and interleukin-3. *Blood* **84**, 3667-74 (1994).
66. Irani, A.M. et al. Recombinant human stem cell factor stimulates differentiation of mast cells from dispersed human fetal liver cells. *Blood* **80**, 3009-21 (1992).
67. Rennick, D., Hunte, B., Holland, G. & Thompson-Snipes, L. Cofactors are essential for stem cell factor-dependent growth and maturation of mast cell progenitors: comparative effects of interleukin-3 (IL-3), IL-4, IL-10, and fibroblasts. *Blood* **85**, 57-65 (1995).
68. Meininger, C.J. et al. The c-kit receptor ligand functions as a mast cell chemoattractant. *Blood* **79**, 958-63 (1992).
69. Kiener, H.P. et al. Tumor necrosis factor alpha promotes the expression of stem cell factor in synovial fibroblasts and their capacity to induce mast cell chemotaxis. *Arthritis Rheum* **43**, 164-74 (2000).
70. Olsson, N., Rak, S. & Nilsson, G. Demonstration of mast cell chemotactic activity in bronchoalveolar lavage fluid collected from asthmatic patients before and during pollen season. *J Allergy Clin Immunol* **105**, 455-61 (2000).
71. Dastyg, J. & Metcalfe, D.D. Stem cell factor induces mast cell adhesion to fibronectin. *J Immunol* **152**, 213-9 (1994).
72. Lorentz, A., Schuppan, D., Gebert, A., Manns, M.P. & Bischoff, S.C. Regulatory effects of stem cell factor and interleukin-4 on adhesion of human mast cells to extracellular matrix proteins. *Blood* **99**, 966-72 (2002).
73. Takeuchi, K. et al. STI571 inhibits growth and adhesion of human mast cells in culture. *J Leukoc Biol* **74**, 1026-34 (2003).

74. Columbo, M. et al. The human recombinant c-kit receptor ligand, rhSCF, induces mediator release from human cutaneous mast cells and enhances IgE-dependent mediator release from both skin mast cells and peripheral blood basophils. *J Immunol* **149**, 599-608 (1992).
75. Takaishi, T. et al. Effect of cytokines on mediator release from human dispersed lung mast cells. *Allergy* **49**, 837-42 (1994).
76. Gibbs, B.F., Arm, J.P., Gibson, K., Lee, T.H. & Pearce, F.L. Human lung mast cells release small amounts of interleukin-4 and tumour necrosis factor-alpha in response to stimulation by anti-IgE and stem cell factor. *Eur J Pharmacol* **327**, 73-8 (1997).
77. Bischoff, S.C. & Dahinden, C.A. c-kit ligand: a unique potentiator of mediator release by human lung mast cells. *J Exp Med* **175**, 237-44 (1992).
78. Oliveira, S.H. & Lukacs, N.W. Stem cell factor and igE-stimulated murine mast cells produce chemokines (CCL2, CCL17, CCL22) and express chemokine receptors. *Inflamm Res* **50**, 168-74 (2001).
79. Baghestanian, M. et al. The c-kit ligand stem cell factor and anti-IgE promote expression of monocyte chemoattractant protein-1 in human lung mast cells. *Blood* **90**, 4438-49 (1997).
80. Okayama, Y. & Kawakami, T. Development, migration, and survival of mast cells. *Immunol Res* **34**, 97-115 (2006).
81. Hartman, M., Piliponsky, A.M., Temkin, V. & Levi-Schaffer, F. Human peripheral blood eosinophils express stem cell factor. *Blood* **97**, 1086-91 (2001).
82. Oliveira, S.H. et al. Stem cell factor induces eosinophil activation and degranulation: mediator release and gene array analysis. *Blood* **100**, 4291-7 (2002).
83. Huang, E. et al. The hematopoietic growth factor KL is encoded by the Sl locus and is the ligand of the c-kit receptor, the gene product of the W locus. *Cell* **63**, 225-33 (1990).
84. Martin, F.H. et al. Primary structure and functional expression of rat and human stem cell factor DNAs. *Cell* **63**, 203-11 (1990).
85. Anderson, D.M. et al. Alternate splicing of mRNAs encoding human mast cell growth factor and localization of the gene to chromosome 12q22-q24. *Cell Growth Differ* **2**, 373-8 (1991).
86. Gallea-Robache, S. et al. A metalloproteinase inhibitor blocks the shedding of soluble cytokine receptors and processing of transmembrane cytokine precursors in human monocytic cells. *Cytokine* **9**, 340-6 (1997).
87. Chesneau, V. et al. Catalytic properties of ADAM19. *J Biol Chem* **278**, 22331-40 (2003).
88. Zou, J. et al. Catalytic activity of human ADAM33. *J Biol Chem* **279**, 9818-30 (2004).
89. Heissig, B. et al. Recruitment of stem and progenitor cells from the bone marrow niche requires MMP-9 mediated release of kit-ligand. *Cell* **109**, 625-37 (2002).
90. Langley, K.E. et al. Purification and characterization of soluble forms of human and rat stem cell factor recombinantly expressed by Escherichia coli and by Chinese hamster ovary cells. *Arch Biochem Biophys* **295**, 21-8 (1992).
91. Langley, K.E. et al. Soluble stem cell factor in human serum. *Blood* **81**, 656-60 (1993).

92. Majumdar, M.K., Feng, L., Medlock, E., Toksoz, D. & Williams, D.A. Identification and mutation of primary and secondary proteolytic cleavage sites in murine stem cell factor cDNA yields biologically active, cell-associated protein. *J Biol Chem* **269**, 1237-42 (1994).
93. Huang, E.J., Nocka, K.H., Buck, J. & Besmer, P. Differential expression and processing of two cell associated forms of the kit-ligand: KL-1 and KL-2. *Mol Biol Cell* **3**, 349-62 (1992).
94. Kassel, O. et al. Human bronchial smooth muscle cells in culture produce stem cell factor. *Eur Respir J* **13**, 951-4 (1999).
95. Welker, P., Grabbe, J., Gibbs, B., Zuberbier, T. & Henz, B.M. Human mast cells produce and differentially express both soluble and membrane-bound stem cell factor. *Scand J Immunol* **49**, 495-500 (1999).
96. Mauduit, C. et al. Regulation by pH of the alternative splicing of the stem cell factor pre-mRNA in the testis. *J Biol Chem* **274**, 770-5 (1999).
97. Brannan, C.I. et al. Steel-Dickie mutation encodes a c-kit ligand lacking transmembrane and cytoplasmic domains. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 4671-4 (1991).
98. Flanagan, J.G., Chan, D.C. & Leder, P. Transmembrane form of the kit ligand growth factor is determined by alternative splicing and is missing in the Sld mutant. *Cell* **64**, 1025-35 (1991).
99. Nakayama, H. et al. Studies of Sl/Sld in equilibrium with +/+ mouse aggregation chimaeras. II. Effect of the steel locus on spermatogenesis. *Development* **102**, 117-26 (1988).
100. Manning, G., Whyte, D.B., Martinez, R., Hunter, T. & Sudarsanam, S. The protein kinase complement of the human genome. *Science* **298**, 1912-34 (2002).
101. Robinson, D.R., Wu, Y.M. & Lin, S.F. The protein tyrosine kinase family of the human genome. *Oncogene* **19**, 5548-57 (2000).
102. Blume-Jensen, P. & Hunter, T. Oncogenic kinase signalling. *Nature* **411**, 355-65 (2001).
103. Liu, H., Chen, X., Focia, P.J. & He, X. Structural basis for stem cell factor-KIT signaling and activation of class III receptor tyrosine kinases. *Embo J* **26**, 891-901 (2007).
104. Yuzawa, S. et al. Structural basis for activation of the receptor tyrosine kinase KIT by stem cell factor. *Cell* **130**, 323-34 (2007).
105. Mol, C.D. et al. Structure of a c-kit product complex reveals the basis for kinase transactivation. *J Biol Chem* **278**, 31461-4 (2003).
106. Huse, M. & Kuriyan, J. The conformational plasticity of protein kinases. *Cell* **109**, 275-82 (2002).
107. Mol, C.D. et al. Structural basis for the autoinhibition and STI-571 inhibition of c-Kit tyrosine kinase. *J Biol Chem* **279**, 31655-63 (2004).
108. Chan, P.M., Ilangumaran, S., La Rose, J., Chakrabarty, A. & Rottapel, R. Autoinhibition of the kit receptor tyrosine kinase by the cytosolic juxtamembrane region. *Mol Cell Biol* **23**, 3067-78 (2003).
109. Hayashi, S., Kunisada, T., Ogawa, M., Yamaguchi, K. & Nishikawa, S. Exon skipping by mutation of an authentic splice site of c-kit gene in WW mouse. *Nucleic Acids Res* **19**, 1267-71 (1991).

110. Crosier, P.S. et al. Expression of isoforms of the human receptor tyrosine kinase c-kit in leukemic cell lines and acute myeloid leukemia. *Blood* **82**, 1151-8 (1993).
111. Reith, A.D. et al. Signal transduction by normal isoforms and W mutant variants of the Kit receptor tyrosine kinase. *Embo J* **10**, 2451-9 (1991).
112. Caruana, G., Cambareri, A.C. & Ashman, L.K. Isoforms of c-KIT differ in activation of signalling pathways and transformation of NIH3T3 fibroblasts. *Oncogene* **18**, 5573-81 (1999).
113. Voytyuk, O. et al. Src family kinases are involved in the differential signaling from two splice forms of c-Kit. *J Biol Chem* **278**, 9159-66 (2003).
114. Sun, J., Pedersen, M. & Ronnstrand, L. Gab2 is involved in differential phosphoinositide 3-kinase signaling by two splice forms of c-Kit. *J Biol Chem* **283**, 27444-51 (2008).
115. Piao, X., Curtis, J.E., Minkin, S., Minden, M.D. & Bernstein, A. Expression of the Kit and KitA receptor isoforms in human acute myelogenous leukemia. *Blood* **83**, 476-81 (1994).
116. Majumder, S., Brown, K., Qiu, F.H. & Besmer, P. c-kit protein, a transmembrane kinase: identification in tissues and characterization. *Mol Cell Biol* **8**, 4896-903 (1988).
117. Cruz, A.C. et al. Tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme controls surface expression of c-Kit and survival of embryonic stem cell-derived mast cells. *J Biol Chem* **279**, 5612-20 (2004).
118. Turner, A.M. et al. Identification and characterization of a soluble c-kit receptor produced by human hematopoietic cell lines. *Blood* **85**, 2052-8 (1995).
119. Brizzi, M.F. et al. Protein kinase C-dependent release of a functional whole extracellular domain of the mast cell growth factor (MGF) receptor by MGF-dependent human myeloid cells. *Oncogene* **9**, 1583-9 (1994).
120. Heinrich, M.C. et al. Kinase mutations and imatinib response in patients with metastatic gastrointestinal stromal tumor. *J Clin Oncol* **21**, 4342-9 (2003).
121. Bono, P. et al. Serum KIT and KIT ligand levels in patients with gastrointestinal stromal tumors treated with imatinib. *Blood* **103**, 2929-35 (2004).
122. Citri, A. & Yarden, Y. EGF-ERBB signalling: towards the systems level. *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**, 505-16 (2006).
123. Jallal, B., Schlessinger, J. & Ullrich, A. Tyrosine phosphatase inhibition permits analysis of signal transduction complexes in p185HER2/neu-overexpressing human tumor cells. *J Biol Chem* **267**, 4357-63 (1992).
124. Pawson, T. Protein modules and signalling networks. *Nature* **373**, 573-80 (1995).
125. Machida, K. & Mayer, B.J. The SH2 domain: versatile signaling module and pharmaceutical target. *Biochim Biophys Acta* **1747**, 1-25 (2005).
126. van der Geer, P. & Pawson, T. The PTB domain: a new protein module implicated in signal transduction. *Trends Biochem Sci* **20**, 277-80 (1995).
127. Uhlik, M.T. et al. Structural and evolutionary division of phosphotyrosine binding (PTB) domains. *J Mol Biol* **345**, 1-20 (2005).
128. Li, S.S. Specificity and versatility of SH3 and other proline-recognition domains: structural basis and implications for cellular signal transduction. *Biochem J* **390**, 641-53 (2005).

129. Thommes, K., Lennartsson, J., Carlberg, M. & Ronnstrand, L. Identification of Tyr-703 and Tyr-936 as the primary association sites for Grb2 and Grb7 in the c-Kit/stem cell factor receptor. *Biochem J* **341** ( Pt 1), 211-6 (1999).
130. Serve, H., Hsu, Y.C. & Besmer, P. Tyrosine residue 719 of the c-kit receptor is essential for binding of the P85 subunit of phosphatidylinositol (PI) 3-kinase and for c-kit-associated PI 3-kinase activity in COS-1 cells. *J Biol Chem* **269**, 6026-30 (1994).
131. Serve, H. et al. Differential roles of PI3-kinase and Kit tyrosine 821 in Kit receptor-mediated proliferation, survival and cell adhesion in mast cells. *Embo J* **14**, 473-83 (1995).
132. Kissel, H. et al. Point mutation in kit receptor tyrosine kinase reveals essential roles for kit signaling in spermatogenesis and oogenesis without affecting other kit responses. *Embo J* **19**, 1312-26 (2000).
133. Blume-Jensen, P., Janknecht, R. & Hunter, T. The kit receptor promotes cell survival via activation of PI 3-kinase and subsequent Akt-mediated phosphorylation of Bad on Ser136. *Curr Biol* **8**, 779-82 (1998).
134. Gommerman, J.L., Sittaro, D., Klebasz, N.Z., Williams, D.A. & Berger, S.A. Differential stimulation of c-Kit mutants by membrane-bound and soluble Steel Factor correlates with leukemic potential. *Blood* **96**, 3734-42 (2000).
135. Lennartsson, J., Wernstedt, C., Engstrom, U., Hellman, U. & Ronnstrand, L. Identification of Tyr900 in the kinase domain of c-Kit as a Src-dependent phosphorylation site mediating interaction with c-Crk. *Exp Cell Res* **288**, 110-8 (2003).
136. Wollberg, P., Lennartsson, J., Gottfridsson, E., Yoshimura, A. & Ronnstrand, L. The adapter protein APS associates with the multifunctional docking sites Tyr-568 and Tyr-936 in c-Kit. *Biochem J* **370**, 1033-8 (2003).
137. Iwaki, S. et al. Kit- and Fc epsilonRI-induced differential phosphorylation of the transmembrane adaptor molecule NTAL/LAB/LAT2 allows flexibility in its scaffolding function in mast cells. *Cell Signal* **20**, 195-205 (2008).
138. Yu, M. et al. The scaffolding adapter Gab2, via Shp-2, regulates kit-evoked mast cell proliferation by activating the Rac/JNK pathway. *J Biol Chem* **281**, 28615-26 (2006).
139. Gu, H. & Neel, B.G. The "Gab" in signal transduction. *Trends Cell Biol* **13**, 122-30 (2003).
140. Sarmay, G., Angyal, A., Kertesz, A., Maus, M. & Medgyesi, D. The multiple function of Grb2 associated binder (Gab) adaptor/scaffolding protein in immune cell signaling. *Immunol Lett* **104**, 76-82 (2006).
141. Horejsi, V., Zhang, W. & Schraven, B. Transmembrane adaptor proteins: organizers of immunoreceptor signalling. *Nat Rev Immunol* **4**, 603-16 (2004).
142. Bain, J. et al. The selectivity of protein kinase inhibitors: a further update. *Biochem J* **408**, 297-315 (2007).
143. Gilfillan, A.M. & Tkaczyk, C. Integrated signalling pathways for mast-cell activation. *Nat Rev Immunol* **6**, 218-30 (2006).
144. Blume-Jensen, P. et al. Kit/stem cell factor receptor-induced activation of phosphatidylinositol 3'-kinase is essential for male fertility. *Nat Genet* **24**, 157-62 (2000).
145. Kimura, Y. et al. Targeted mutations of the juxtamembrane tyrosines in the Kit receptor tyrosine kinase selectively affect multiple cell lineages. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 6015-20 (2004).

146. Agosti, V. et al. Critical role for Kit-mediated Src kinase but not PI 3-kinase signaling in pro T and pro B cell development. *J Exp Med* **199**, 867-78 (2004).
147. Lennartsson, J., Jelacic, T., Linnekin, D. & Shivakrupa, R. Normal and oncogenic forms of the receptor tyrosine kinase kit. *Stem Cells* **23**, 16-43 (2005).
148. Morgan, S.J., Smith, A.D. & Parker, P.J. Purification and characterization of bovine brain type I phosphatidylinositol kinase. *Eur J Biochem* **191**, 761-7 (1990).
149. Auger, K.R., Serunian, L.A., Soltoff, S.P., Libby, P. & Cantley, L.C. PDGF-dependent tyrosine phosphorylation stimulates production of novel polyphosphoinositides in intact cells. *Cell* **57**, 167-75 (1989).
150. Fukao, T. et al. Selective loss of gastrointestinal mast cells and impaired immunity in PI3K-deficient mice. *Nat Immunol* **3**, 295-304 (2002).
151. Lu-Kuo, J.M., Fruman, D.A., Joyal, D.M., Cantley, L.C. & Katz, H.R. Impaired kit- but not FcepsilonRI-initiated mast cell activation in the absence of phosphoinositide 3-kinase p85alpha gene products. *J Biol Chem* **275**, 6022-9 (2000).
152. Vosseller, K., Stella, G., Yee, N.S. & Besmer, P. c-kit receptor signaling through its phosphatidylinositide-3'-kinase-binding site and protein kinase C: role in mast cell enhancement of degranulation, adhesion, and membrane ruffling. *Mol Biol Cell* **8**, 909-22 (1997).
153. Tan, B.L. et al. Genetic evidence for convergence of c-Kit- and alpha4 integrin-mediated signals on class IA PI-3kinase and the Rac pathway in regulating integrin-directed migration in mast cells. *Blood* **101**, 4725-32 (2003).
154. Wilde, J.I. & Watson, S.P. Regulation of phospholipase C gamma isoforms in haematopoietic cells: why one, not the other? *Cell Signal* **13**, 691-701 (2001).
155. Wang, D. et al. Phospholipase Cgamma2 is essential in the functions of B cell and several Fc receptors. *Immunity* **13**, 25-35 (2000).
156. Kerner, J.D. et al. Impaired expansion of mouse B cell progenitors lacking Btk. *Immunity* **3**, 301-12 (1995).
157. Koike, T., Hirai, K., Morita, Y. & Nozawa, Y. Stem cell factor-induced signal transduction in rat mast cells. Activation of phospholipase D but not phosphoinositide-specific phospholipase C in c-kit receptor stimulation. *J Immunol* **151**, 359-66 (1993).
158. Trieselmann, N.Z., Soboloff, J. & Berger, S.A. Mast cells stimulated by membrane-bound, but not soluble, steel factor are dependent on phospholipase C activation. *Cell Mol Life Sci* **60**, 759-66 (2003).
159. Neta, R., Williams, D., Selzer, F. & Abrams, J. Inhibition of c-kit ligand/steel factor by antibodies reduces survival of lethally irradiated mice. *Blood* **81**, 324-7 (1993).
160. Plo, I. et al. Kit signaling and negative regulation of daunorubicin-induced apoptosis: role of phospholipase Cgamma. *Oncogene* **20**, 6752-63 (2001).
161. Maddens, S. et al. Kit signaling inhibits the sphingomyelin-ceramide pathway through PLC gamma 1: implication in stem cell factor radioprotective effect. *Blood* **100**, 1294-301 (2002).
162. Tauchi, T. et al. The ubiquitously expressed Syp phosphatase interacts with c-kit and Grb2 in hematopoietic cells. *J Biol Chem* **269**, 25206-11 (1994).

163. Price, D.J. et al. Direct association of Csk homologous kinase (CHK) with the diphosphorylated site Tyr568/570 of the activated c-KIT in megakaryocytes. *J Biol Chem* **272**, 5915-20 (1997).
164. Hong, L., Munugalavadla, V. & Kapur, R. c-Kit-mediated overlapping and unique functional and biochemical outcomes via diverse signaling pathways. *Mol Cell Biol* **24**, 1401-10 (2004).
165. Nishida, K. et al. Requirement of Gab2 for mast cell development and KitL/c-Kit signaling. *Blood* **99**, 1866-9 (2002).
166. Uchida, M. et al. A functional role of mitogen-activated protein kinases, erk1 and erk2, in the differentiation of a human leukemia cell line, UT-7/GM: a possible key factor for cell fate determination toward erythroid and megakaryocytic lineages. *Int J Hematol* **73**, 78-83 (2001).
167. Thomas, S.M. & Brugge, J.S. Cellular functions regulated by Src family kinases. *Annu Rev Cell Dev Biol* **13**, 513-609 (1997).
168. Ingley, E. Src family kinases: regulation of their activities, levels and identification of new pathways. *Biochim Biophys Acta* **1784**, 56-65 (2008).
169. Tatton, L., Morley, G.M., Chopra, R. & Khwaja, A. The Src-selective kinase inhibitor PP1 also inhibits Kit and Bcr-Abl tyrosine kinases. *J Biol Chem* **278**, 4847-53 (2003).
170. Lombardo, L.J. et al. Discovery of N-(2-chloro-6-methyl-phenyl)-2-(6-(4-(2-hydroxyethyl)-piperazin-1-yl)-2-methylpyrimidin-4-ylamino)thiazole-5-carboxamide (BMS-354825), a dual Src/Abl kinase inhibitor with potent antitumor activity in preclinical assays. *J Med Chem* **47**, 6658-61 (2004).
171. Hong, H. et al. The Src family kinase Hck regulates mast cell activation by suppressing an inhibitory Src family kinase Lyn. *Blood* **110**, 2511-9 (2007).
172. Linnekin, D., DeBerry, C.S. & Mou, S. Lyn associates with the juxtamembrane region of c-Kit and is activated by stem cell factor in hematopoietic cell lines and normal progenitor cells. *J Biol Chem* **272**, 27450-5 (1997).
173. Lennartsson, J. et al. Phosphorylation of Shc by Src family kinases is necessary for stem cell factor receptor/c-kit mediated activation of the Ras/MAP kinase pathway and c-fos induction. *Oncogene* **18**, 5546-53 (1999).
174. Timokhina, I., Kissel, H., Stella, G. & Besmer, P. Kit signaling through PI 3-kinase and Src kinase pathways: an essential role for Rac1 and JNK activation in mast cell proliferation. *Embo J* **17**, 6250-62 (1998).
175. Samayawardhena, L.A., Kapur, R. & Craig, A.W. Involvement of Fyn kinase in Kit and integrin-mediated Rac activation, cytoskeletal reorganization, and chemotaxis of mast cells. *Blood* **109**, 3679-86 (2007).
176. Hernandez-Hansen, V., Mackay, G.A., Lowell, C.A., Wilson, B.S. & Oliver, J.M. The Src kinase Lyn is a negative regulator of mast cell proliferation. *J Leukoc Biol* **75**, 143-51 (2004).
177. Odom, S. et al. Negative regulation of immunoglobulin E-dependent allergic responses by Lyn kinase. *J Exp Med* **199**, 1491-502 (2004).
178. O'Laughlin-Bunner, B. et al. Lyn is required for normal stem cell factor-induced proliferation and chemotaxis of primary hematopoietic cells. *Blood* **98**, 343-50 (2001).
179. Tan, B.L., Hong, L., Munugalavadla, V. & Kapur, R. Functional and biochemical consequences of abrogating the activation of multiple diverse early signaling pathways in Kit. Role for Src kinase pathway in Kit-induced cooperation with erythropoietin receptor. *J Biol Chem* **278**, 11686-95 (2003).

180. Ueda, S. et al. Critical roles of c-Kit tyrosine residues 567 and 719 in stem cell factor-induced chemotaxis: contribution of src family kinase and PI3-kinase on calcium mobilization and cell migration. *Blood* **99**, 3342-9 (2002).
181. Broudy, V.C. et al. Signaling via Src family kinases is required for normal internalization of the receptor c-Kit. *Blood* **94**, 1979-86 (1999).
182. Shuai, K. & Liu, B. Regulation of JAK-STAT signalling in the immune system. *Nat Rev Immunol* **3**, 900-11 (2003).
183. Brizzi, M.F. et al. Convergence of signaling by interleukin-3, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, and mast cell growth factor on JAK2 tyrosine kinase. *J Biol Chem* **269**, 31680-4 (1994).
184. Weiler, S.R. et al. JAK2 is associated with the c-kit proto-oncogene product and is phosphorylated in response to stem cell factor. *Blood* **87**, 3688-93 (1996).
185. Linnekin, D. et al. JAK2 is constitutively associated with c-Kit and is phosphorylated in response to stem cell factor. *Acta Haematol* **95**, 224-8 (1996).
186. Radosevic, N. et al. JAK2 contributes to the intrinsic capacity of primary hematopoietic cells to respond to stem cell factor. *Exp Hematol* **32**, 149-56 (2004).
187. Brizzi, M.F., Dentelli, P., Rosso, A., Yarden, Y. & Pegoraro, L. STAT protein recruitment and activation in c-Kit deletion mutants. *J Biol Chem* **274**, 16965-72 (1999).
188. Deberry, C., Mou, S. & Linnekin, D. Stat1 associates with c-kit and is activated in response to stem cell factor. *Biochem J* **327** ( Pt 1), 73-80 (1997).
189. Ryan, J.J. et al. Stem cell factor activates STAT-5 DNA binding in IL-3-derived bone marrow mast cells. *Exp Hematol* **25**, 357-62 (1997).
190. Jacobs-Helber, S.M., Penta, K., Sun, Z., Lawson, A. & Sawyer, S.T. Distinct signaling from stem cell factor and erythropoietin in HCD57 cells. *J Biol Chem* **272**, 6850-3 (1997).
191. Joneja, B., Chen, H.C., Seshasayee, D., Wrentmore, A.L. & Wojchowski, D.M. Mechanisms of stem cell factor and erythropoietin proliferative co-signaling in FDC2-ER cells. *Blood* **90**, 3533-45 (1997).
192. O'Farrell, A.M., Ichihara, M., Mui, A.L. & Miyajima, A. Signaling pathways activated in a unique mast cell line where interleukin-3 supports survival and stem cell factor is required for a proliferative response. *Blood* **87**, 3655-68 (1996).
193. Schlessinger, J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* **103**, 211-25 (2000).
194. Maisonpierre, P.C. et al. Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts in vivo angiogenesis. *Science* **277**, 55-60 (1997).
195. Cochet, C., Gill, G.N., Meisenhelder, J., Cooper, J.A. & Hunter, T. C-kinase phosphorylates the epidermal growth factor receptor and reduces its epidermal growth factor-stimulated tyrosine protein kinase activity. *J Biol Chem* **259**, 2553-8 (1984).
196. Blume-Jensen, P., Siegbahn, A., Stabel, S., Heldin, C.H. & Ronnstrand, L. Increased Kit/SCF receptor induced mitogenicity but abolished cell motility after inhibition of protein kinase C. *Embo J* **12**, 4199-209 (1993).

197. Blume-Jensen, P., Wernstedt, C., Heldin, C.H. & Ronnstrand, L. Identification of the major phosphorylation sites for protein kinase C in kit/stem cell factor receptor in vitro and in intact cells. *J Biol Chem* **270**, 14192-200 (1995).
198. Yee, N.S., Hsiau, C.W., Serve, H., Vosseller, K. & Besmer, P. Mechanism of down-regulation of c-kit receptor. Roles of receptor tyrosine kinase, phosphatidylinositol 3'-kinase, and protein kinase C. *J Biol Chem* **269**, 31991-8 (1994).
199. Tonks, N.K. Protein tyrosine phosphatases: from genes, to function, to disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**, 833-46 (2006).
200. Schmidt-Arras, D.E. et al. Tyrosine phosphorylation regulates maturation of receptor tyrosine kinases. *Mol Cell Biol* **25**, 3690-703 (2005).
201. Klamann, L.D. et al. Increased energy expenditure, decreased adiposity, and tissue-specific insulin sensitivity in protein-tyrosine phosphatase 1B-deficient mice. *Mol Cell Biol* **20**, 5479-89 (2000).
202. Elchebly, M. et al. Increased insulin sensitivity and obesity resistance in mice lacking the protein tyrosine phosphatase-1B gene. *Science* **283**, 1544-8 (1999).
203. Bignon, J.S. & Siminovitch, K.A. Identification of PTP1C mutation as the genetic defect in motheaten and viable motheaten mice: a step toward defining the roles of protein tyrosine phosphatases in the regulation of hemopoietic cell differentiation and function. *Clin Immunol Immunopathol* **73**, 168-79 (1994).
204. Paulson, R.F., Vesely, S., Siminovitch, K.A. & Bernstein, A. Signalling by the W/Kit receptor tyrosine kinase is negatively regulated in vivo by the protein tyrosine phosphatase Shp1. *Nat Genet* **13**, 309-15 (1996).
205. Lorenz, U. et al. Genetic analysis reveals cell type-specific regulation of receptor tyrosine kinase c-Kit by the protein tyrosine phosphatase SHP1. *J Exp Med* **184**, 1111-26 (1996).
206. Yi, T. & Ihle, J.N. Association of hematopoietic cell phosphatase with c-Kit after stimulation with c-Kit ligand. *Mol Cell Biol* **13**, 3350-8 (1993).
207. Kozlowski, M. et al. SHP-1 binds and negatively modulates the c-Kit receptor by interaction with tyrosine 569 in the c-Kit juxtamembrane domain. *Mol Cell Biol* **18**, 2089-99 (1998).
208. Keilhack, H. et al. Phosphotyrosine 1173 mediates binding of the protein-tyrosine phosphatase SHP-1 to the epidermal growth factor receptor and attenuation of receptor signaling. *J Biol Chem* **273**, 24839-46 (1998).
209. Umeda, S. et al. Deficiency of SHP-1 protein-tyrosine phosphatase activity results in heightened osteoclast function and decreased bone density. *Am J Pathol* **155**, 223-33 (1999).
210. Yoshimura, A., Naka, T. & Kubo, M. SOCS proteins, cytokine signalling and immune regulation. *Nat Rev Immunol* **7**, 454-65 (2007).
211. Croker, B.A., Kiu, H. & Nicholson, S.E. SOCS regulation of the JAK/STAT signalling pathway. *Semin Cell Dev Biol* **19**, 414-22 (2008).
212. Bergamin, E., Wu, J. & Hubbard, S.R. Structural basis for phosphotyrosine recognition by suppressor of cytokine signaling-3. *Structure* **14**, 1285-92 (2006).
213. De Sepulveda, P. et al. Socs1 binds to multiple signalling proteins and suppresses steel factor-dependent proliferation. *Embo J* **18**, 904-15 (1999).

214. Haglund, K., Di Fiore, P.P. & Dikic, I. Distinct monoubiquitin signals in receptor endocytosis. *Trends Biochem Sci* **28**, 598-603 (2003).
215. Thien, C.B. & Langdon, W.Y. Negative regulation of PTK signalling by Cbl proteins. *Growth Factors* **23**, 161-7 (2005).
216. Soubeyran, P., Kowanetz, K., Szymkiewicz, I., Langdon, W.Y. & Dikic, I. Cbl-CIN85-endophilin complex mediates ligand-induced downregulation of EGF receptors. *Nature* **416**, 183-7 (2002).
217. Wiley, H.S. & Burke, P.M. Regulation of receptor tyrosine kinase signaling by endocytic trafficking. *Traffic* **2**, 12-8 (2001).
218. Katzmann, D.J., Odorizzi, G. & Emr, S.D. Receptor downregulation and multivesicular-body sorting. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**, 893-905 (2002).
219. Kile, B.T. et al. The SOCS box: a tale of destruction and degradation. *Trends Biochem Sci* **27**, 235-41 (2002).
220. Piessevaux, J., Lavens, D., Peelman, F. & Tavernier, J. The many faces of the SOCS box. *Cytokine Growth Factor Rev* **19**, 371-81 (2008).
221. Kario, E. et al. Suppressors of cytokine signaling 4 and 5 regulate epidermal growth factor receptor signaling. *J Biol Chem* **280**, 7038-48 (2005).
222. Nicholson, S.E. et al. Suppressor of cytokine signaling (SOCS)-5 is a potential negative regulator of epidermal growth factor signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 2328-33 (2005).
223. Bayle, J., Letard, S., Frank, R., Dubreuil, P. & De Sepulveda, P. Suppressor of cytokine signaling 6 associates with KIT and regulates KIT receptor signaling. *J Biol Chem* **279**, 12249-59 (2004).
224. Dong, J., Chen, W., Welford, A. & Wandinger-Ness, A. The proteasome alpha-subunit XAPC7 interacts specifically with Rab7 and late endosomes. *J Biol Chem* **279**, 21334-42 (2004).
225. Shimizu, Y., Ashman, L.K., Du, Z. & Schwartz, L.B. Internalization of Kit together with stem cell factor on human fetal liver-derived mast cells: new protein and RNA synthesis are required for reappearance of Kit. *J Immunol* **156**, 3443-9 (1996).
226. Broudy, V.C., Lin, N.L., Buhring, H.J., Komatsu, N. & Kavanagh, T.J. Analysis of c-kit receptor dimerization by fluorescence resonance energy transfer. *Blood* **91**, 898-906 (1998).
227. Jahn, T. et al. Analysing c-kit internalization using a functional c-kit-EGFP chimera containing the fluorochrome within the extracellular domain. *Oncogene* **21**, 4508-20 (2002).
228. Gommerman, J.L., Rottapel, R. & Berger, S.A. Phosphatidylinositol 3-kinase and Ca<sup>2+</sup> influx dependence for ligand-stimulated internalization of the c-Kit receptor. *J Biol Chem* **272**, 30519-25 (1997).
229. Masson, K., Heiss, E., Band, H. & Ronnstrand, L. Direct binding of Cbl to Tyr568 and Tyr936 of the stem cell factor receptor/c-Kit is required for ligand-induced ubiquitination, internalization and degradation. *Biochem J* **399**, 59-67 (2006).
230. Zeng, S., Xu, Z., Lipkowitz, S. & Longley, J.B. Regulation of stem cell factor receptor signaling by Cbl family proteins (Cbl-b/c-Cbl). *Blood* **105**, 226-32 (2005).
231. Yokouchi, M. et al. APS, an adaptor protein containing PH and SH2 domains, is associated with the PDGF receptor and c-Cbl and inhibits PDGF-induced mitogenesis. *Oncogene* **18**, 759-67 (1999).

232. Brizzi, M.F. et al. Discrete protein interactions with the Grb2/c-Cbl complex in SCF- and TPO-mediated myeloid cell proliferation. *Oncogene* **13**, 2067-76 (1996).
233. Sun, J., Pedersen, M., Bengtsson, S. & Ronnstrand, L. Grb2 mediates negative regulation of stem cell factor receptor/c-Kit signaling by recruitment of Cbl. *Exp Cell Res* **313**, 3935-42 (2007).
234. Miyazawa, K. et al. Ligand-dependent polyubiquitination of c-kit gene product: a possible mechanism of receptor down modulation in M07e cells. *Blood* **83**, 137-45 (1994).
235. Marshall, C.J. Specificity of receptor tyrosine kinase signaling: transient versus sustained extracellular signal-regulated kinase activation. *Cell* **80**, 179-85 (1995).
236. Madhani, H.D. Accounting for specificity in receptor tyrosine kinase signaling. *Cell* **106**, 9-11 (2001).
237. Fambrough, D., McClure, K., Kazlauskas, A. & Lander, E.S. Diverse signaling pathways activated by growth factor receptors induce broadly overlapping, rather than independent, sets of genes. *Cell* **97**, 727-41 (1999).
238. Pawson, T. & Saxton, T.M. Signaling networks--do all roads lead to the same genes? *Cell* **97**, 675-8 (1999).
239. Mohammadi, M. et al. Identification of six novel autophosphorylation sites on fibroblast growth factor receptor 1 and elucidation of their importance in receptor activation and signal transduction. *Mol Cell Biol* **16**, 977-89 (1996).
240. Landgren, E., Blume-Jensen, P., Courtneidge, S.A. & Claesson-Welsh, L. Fibroblast growth factor receptor-1 regulation of Src family kinases. *Oncogene* **10**, 2027-35 (1995).
241. Nagashima, T. et al. Quantitative transcriptional control of ErbB receptor signaling undergoes graded to biphasic response for cell differentiation. *J Biol Chem* **282**, 4045-56 (2007).
242. De Donatis, A. et al. Proliferation versus migration in platelet-derived growth factor signaling: the key role of endocytosis. *J Biol Chem* **283**, 19948-56 (2008).
243. Mayor, S. & Pagano, R.E. Pathways of clathrin-independent endocytosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**, 603-12 (2007).
244. Sigismund, S. et al. Clathrin-independent endocytosis of ubiquitinated cargos. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 2760-5 (2005).
245. Acconcia, F., Sigismund, S. & Polo, S. Ubiquitin in trafficking: the network at work. *Exp Cell Res* **315**, 1610-8 (2009).
246. Sigismund, S. et al. Clathrin-mediated internalization is essential for sustained EGFR signaling but dispensable for degradation. *Dev Cell* **15**, 209-19 (2008).
247. Di Guglielmo, G.M., Le Roy, C., Goodfellow, A.F. & Wrana, J.L. Distinct endocytic pathways regulate TGF-beta receptor signalling and turnover. *Nat Cell Biol* **5**, 410-21 (2003).
248. Choi, S.C. et al. Regulation of activin/nodal signaling by Rap2-directed receptor trafficking. *Dev Cell* **15**, 49-61 (2008).
249. Yamamoto, H., Sakane, H., Michiue, T. & Kikuchi, A. Wnt3a and Dkk1 regulate distinct internalization pathways of LRP6 to tune the activation of beta-catenin signaling. *Dev Cell* **15**, 37-48 (2008).
250. Gonzalez-Gaitan, M. The garden of forking paths: recycling, signaling, and degradation. *Dev Cell* **15**, 172-4 (2008).

251. Tajima, Y. et al. Consequences of exclusive expression in vivo of Kit-ligand lacking the major proteolytic cleavage site. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 11903-8 (1998).
252. Toksoz, D. et al. Support of human hematopoiesis in long-term bone marrow cultures by murine stromal cells selectively expressing the membrane-bound and secreted forms of the human homolog of the steel gene product, stem cell factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 7350-4 (1992).
253. Miyazawa, K. et al. Membrane-bound Steel factor induces more persistent tyrosine kinase activation and longer life span of c-kit gene-encoded protein than its soluble form. *Blood* **85**, 641-9 (1995).
254. Heinrich, R., Neel, B.G. & Rapoport, T.A. Mathematical models of protein kinase signal transduction. *Mol Cell* **9**, 957-70 (2002).
255. Hornberg, J.J. et al. Principles behind the multifarious control of signal transduction. ERK phosphorylation and kinase/phosphatase control. *Febs J* **272**, 244-58 (2005).
256. Ostman, A. & Bohmer, F.D. Regulation of receptor tyrosine kinase signaling by protein tyrosine phosphatases. *Trends Cell Biol* **11**, 258-66 (2001).
257. Vetter, S.W., Keng, Y.F., Lawrence, D.S. & Zhang, Z.Y. Assessment of protein-tyrosine phosphatase 1B substrate specificity using "inverse alanine scanning". *J Biol Chem* **275**, 2265-8 (2000).
258. Denu, J.M. & Tanner, K.G. Specific and reversible inactivation of protein tyrosine phosphatases by hydrogen peroxide: evidence for a sulfenic acid intermediate and implications for redox regulation. *Biochemistry* **37**, 5633-42 (1998).
259. Rhee, S.G., Bae, Y.S., Lee, S.R. & Kwon, J. Hydrogen peroxide: a key messenger that modulates protein phosphorylation through cysteine oxidation. *Sci STKE* **2000**, pe1 (2000).
260. Chiarugi, P. & Cirri, P. Redox regulation of protein tyrosine phosphatases during receptor tyrosine kinase signal transduction. *Trends Biochem Sci* **28**, 509-14 (2003).
261. Uchida, T. et al. Insulin stimulates the phosphorylation of Tyr538 and the catalytic activity of PTP1C, a protein tyrosine phosphatase with Src homology-2 domains. *J Biol Chem* **269**, 12220-8 (1994).
262. Barford, D. & Neel, B.G. Revealing mechanisms for SH2 domain mediated regulation of the protein tyrosine phosphatase SHP-2. *Structure* **6**, 249-54 (1998).
263. Yudushkin, I.A. et al. Live-cell imaging of enzyme-substrate interaction reveals spatial regulation of PTP1B. *Science* **315**, 115-9 (2007).
264. Kholodenko, B.N., Hoek, J.B. & Westerhoff, H.V. Why cytoplasmic signalling proteins should be recruited to cell membranes. *Trends Cell Biol* **10**, 173-8 (2000).
265. Kholodenko, B.N. Four-dimensional organization of protein kinase signaling cascades: the roles of diffusion, endocytosis and molecular motors. *J Exp Biol* **206**, 2073-82 (2003).
266. Miaczynska, M. & Zerial, M. Mosaic organization of the endocytic pathway. *Exp Cell Res* **272**, 8-14 (2002).
267. Pfeffer, S. Membrane domains in the secretory and endocytic pathways. *Cell* **112**, 507-17 (2003).

268. Zerial, M. & McBride, H. Rab proteins as membrane organizers. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**, 107-17 (2001).
269. Vieira, A.V., Lamaze, C. & Schmid, S.L. Control of EGF receptor signaling by clathrin-mediated endocytosis. *Science* **274**, 2086-9 (1996).
270. Wang, Y., Pennock, S.D., Chen, X., Kazlauskas, A. & Wang, Z. Platelet-derived growth factor receptor-mediated signal transduction from endosomes. *J Biol Chem* **279**, 8038-46 (2004).
271. Kholodenko, B.N. MAP kinase cascade signaling and endocytic trafficking: a marriage of convenience? *Trends Cell Biol* **12**, 173-7 (2002).
272. McKay, M.M. & Morrison, D.K. Integrating signals from RTKs to ERK/MAPK. *Oncogene* **26**, 3113-21 (2007).
273. Ye, H., Kuruvilla, R., Zweifel, L.S. & Ginty, D.D. Evidence in support of signaling endosome-based retrograde survival of sympathetic neurons. *Neuron* **39**, 57-68 (2003).
274. Howe, C.L. & Mobley, W.C. Signaling endosome hypothesis: A cellular mechanism for long distance communication. *J Neurobiol* **58**, 207-16 (2004).
275. Miaczynska, M., Pelkmans, L. & Zerial, M. Not just a sink: endosomes in control of signal transduction. *Curr Opin Cell Biol* **16**, 400-6 (2004).
276. Hurley, J.H., Lee, S. & Prag, G. Ubiquitin-binding domains. *Biochem J* **399**, 361-72 (2006).
277. Duarte, R.F. & Franf, D.A. The synergy between stem cell factor (SCF) and granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF): molecular basis and clinical relevance. *Leuk Lymphoma* **43**, 1179-87 (2002).
278. Wu, H., Klingmuller, U., Besmer, P. & Lodish, H.F. Interaction of the erythropoietin and stem-cell-factor receptors. *Nature* **377**, 242-6 (1995).
279. Liu, L., Cutler, R.L., Mui, A.L. & Krystal, G. Steel factor stimulates the serine/threonine phosphorylation of the interleukin-3 receptor. *J Biol Chem* **269**, 16774-9 (1994).
280. Benson, D.M., Jr. et al. Stem cell factor and interleukin-2/15 combine to enhance MAPK-mediated proliferation of human natural killer cells. *Blood* **113**, 2706-14 (2009).
281. Kapur, R., Cooper, R., Zhang, L. & Williams, D.A. Cross-talk between alpha(4)beta(1)/alpha(5)beta(1) and c-Kit results in opposing effect on growth and survival of hematopoietic cells via the activation of focal adhesion kinase, mitogen-activated protein kinase, and Akt signaling pathways. *Blood* **97**, 1975-81 (2001).
282. Hundley, T.R. et al. Kit and FcepsilonRI mediate unique and convergent signals for release of inflammatory mediators from human mast cells. *Blood* **104**, 2410-7 (2004).
283. Wu, H., Liu, X., Jaenisch, R. & Lodish, H.F. Generation of committed erythroid BFU-E and CFU-E progenitors does not require erythropoietin or the erythropoietin receptor. *Cell* **83**, 59-67 (1995).
284. Lin, C.S., Lim, S.K., D'Agati, V. & Costantini, F. Differential effects of an erythropoietin receptor gene disruption on primitive and definitive erythropoiesis. *Genes Dev* **10**, 154-64 (1996).
285. Wojchowski, D.M. et al. Erythropoietin-dependent erythropoiesis: New insights and questions. *Blood Cells Mol Dis* **36**, 232-8 (2006).
286. Krantz, S.B. Erythropoietin. *Blood* **77**, 419-34 (1991).

287. Sui, X., Krantz, S.B., You, M. & Zhao, Z. Synergistic activation of MAP kinase (ERK1/2) by erythropoietin and stem cell factor is essential for expanded erythropoiesis. *Blood* **92**, 1142-9 (1998).
288. Wu, H., Klingmuller, U., Acurio, A., Hsiao, J.G. & Lodish, H.F. Functional interaction of erythropoietin and stem cell factor receptors is essential for erythroid colony formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 1806-10 (1997).
289. Taylor, M.L. & Metcalfe, D.D. Kit signal transduction. *Hematol Oncol Clin North Am* **14**, 517-35 (2000).
290. Tkaczyk, C. et al. NTAL phosphorylation is a pivotal link between the signaling cascades leading to human mast cell degranulation following Kit activation and Fc epsilon RI aggregation. *Blood* **104**, 207-14 (2004).
291. Graness, A., Hanke, S., Boehmer, F.D., Presek, P. & Liebmann, C. Protein-tyrosine-phosphatase-mediated epidermal growth factor (EGF) receptor transinactivation and EGF receptor-independent stimulation of mitogen-activated protein kinase by bradykinin in A431 cells. *Biochem J* **347**, 441-7 (2000).
292. Singer, S.J. & Nicolson, G.L. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* **175**, 720-31 (1972).
293. Simons, K. & Toomre, D. Lipid rafts and signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol* **1**, 31-9 (2000).
294. Lingwood, D. & Simons, K. Lipid rafts as a membrane-organizing principle. *Science* **327**, 46-50.
295. Pike, L.J. Lipid rafts: bringing order to chaos. *J Lipid Res* **44**, 655-67 (2003).
296. Holowka, D., Sheets, E.D. & Baird, B. Interactions between Fc(epsilon)RI and lipid raft components are regulated by the actin cytoskeleton. *J Cell Sci* **113** (Pt 6), 1009-19 (2000).
297. Sheets, E.D., Holowka, D. & Baird, B. Critical role for cholesterol in Lyn-mediated tyrosine phosphorylation of FcepsilonRI and their association with detergent-resistant membranes. *J Cell Biol* **145**, 877-87 (1999).
298. Lajoie, P., Goetz, J.G., Dennis, J.W. & Nabi, I.R. Lattices, rafts, and scaffolds: domain regulation of receptor signaling at the plasma membrane. *J Cell Biol* **185**, 381-5 (2009).
299. Kapur, R. & Zhang, L. A novel mechanism of cooperation between c-Kit and erythropoietin receptor. Stem cell factor induces the expression of Stat5 and erythropoietin receptor, resulting in efficient proliferation and survival by erythropoietin. *J Biol Chem* **276**, 1099-106 (2001).
300. Bhattacharyya, R.P., Remenyi, A., Yeh, B.J. & Lim, W.A. Domains, motifs, and scaffolds: the role of modular interactions in the evolution and wiring of cell signaling circuits. *Annu Rev Biochem* **75**, 655-80 (2006).
301. Kholodenko, B.N., Hancock, J.F. & Kolch, W. Signalling ballet in space and time. *Nat Rev Mol Cell Biol* **11**, 414-26.
302. Nakayama, K., Satoh, T., Igari, A., Kageyama, R. & Nishida, E. FGF induces oscillations of Hes1 expression and Ras/ERK activation. *Curr Biol* **18**, R332-4 (2008).
303. Brandman, O. & Meyer, T. Feedback loops shape cellular signals in space and time. *Science* **322**, 390-5 (2008).
304. Amit, I., Wides, R. & Yarden, Y. Evolvable signaling networks of receptor tyrosine kinases: relevance of robustness to malignancy and to cancer therapy. *Mol Syst Biol* **3**, 151 (2007).

305. Zwang, Y. & Yarden, Y. Systems biology of growth factor-induced receptor endocytosis. *Traffic* **10**, 349-63 (2009).
306. Kirschner, M. & Gerhart, J. Evolvability. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 8420-7 (1998).
307. Markevich, N.I., Tsyganov, M.A., Hoek, J.B. & Kholodenko, B.N. Long-range signaling by phosphoprotein waves arising from bistability in protein kinase cascades. *Mol Syst Biol* **2**, 61 (2006).
308. Hanahan, D. & Weinberg, R.A. The hallmarks of cancer. *Cell* **100**, 57-70 (2000).
309. Mantovani, A. Cancer: Inflaming metastasis. *Nature* **457**, 36-7 (2009).
310. Kroemer, G. & Pouyssegur, J. Tumor cell metabolism: cancer's Achilles' heel. *Cancer Cell* **13**, 472-82 (2008).
311. Speck, N.A. & Gilliland, D.G. Core-binding factors in haematopoiesis and leukaemia. *Nat Rev Cancer* **2**, 502-13 (2002).
312. Baudot, A.D. et al. The tyrosine kinase Syk regulates the survival of chronic lymphocytic leukemia B cells through PKCdelta and proteasome-dependent regulation of Mcl-1 expression. *Oncogene* **28**, 3261-73 (2009).
313. Buchner, M. et al. Spleen tyrosine kinase is overexpressed and represents a potential therapeutic target in chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Res* **69**, 5424-32 (2009).
314. Layton, T., Stalens, C., Gunderson, F., Goodison, S. & Silletti, S. Syk tyrosine kinase acts as a pancreatic adenocarcinoma tumor suppressor by regulating cellular growth and invasion. *Am J Pathol* **175**, 2625-36 (2009).
315. Hoeller, C. et al. The non-receptor-associated tyrosine kinase Syk is a regulator of metastatic behavior in human melanoma cells. *J Invest Dermatol* **124**, 1293-9 (2005).
316. Bailet, O. et al. Spleen tyrosine kinase functions as a tumor suppressor in melanoma cells by inducing senescence-like growth arrest. *Cancer Res* **69**, 2748-56 (2009).
317. Coopman, P.J. et al. The Syk tyrosine kinase suppresses malignant growth of human breast cancer cells. *Nature* **406**, 742-7 (2000).
318. Wang, L., Devarajan, E., He, J., Reddy, S.P. & Dai, J.L. Transcription repressor activity of spleen tyrosine kinase mediates breast tumor suppression. *Cancer Res* **65**, 10289-97 (2005).
319. Kato, M. et al. c-Kit-targeting immunotherapy for hereditary melanoma in a mouse model. *Cancer Res* **64**, 801-6 (2004).
320. Maffini, M.V., Soto, A.M., Sonnenschein, C., Papadopoulos, N. & Theoharides, T.C. Lack of c-kit receptor promotes mammary tumors in N-nitrosomethylurea-treated Ws/Ws rats. *Cancer Cell Int* **8**, 5 (2008).
321. Slamon, D.J. et al. Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science* **244**, 707-12 (1989).
322. Moasser, M.M. Targeting the function of the HER2 oncogene in human cancer therapeutics. *Oncogene* **26**, 6577-92 (2007).
323. Ross, J.S. et al. The HER-2 receptor and breast cancer: ten years of targeted anti-HER-2 therapy and personalized medicine. *Oncologist* **14**, 320-68 (2009).
324. Curtin, J.A., Busam, K., Pinkel, D. & Bastian, B.C. Somatic activation of KIT in distinct subtypes of melanoma. *J Clin Oncol* **24**, 4340-6 (2006).
325. Simak, R. et al. Expression of c-kit and kit-ligand in benign and malignant prostatic tissues. *Histol Histopathol* **15**, 365-74 (2000).

326. Yasuda, A. et al. The stem cell factor/c-kit receptor pathway enhances proliferation and invasion of pancreatic cancer cells. *Mol Cancer* **5**, 46 (2006).
327. Inoue, M., Kyo, S., Fujita, M., Enomoto, T. & Kondoh, G. Coexpression of the c-kit receptor and the stem cell factor in gynecological tumors. *Cancer Res* **54**, 3049-53 (1994).
328. Caceres-Cortes, J.R. et al. Implication of tyrosine kinase receptor and steel factor in cell density-dependent growth in cervical cancers and leukemias. *Cancer Res* **61**, 6281-9 (2001).
329. Cohen, P.S., Chan, J.P., Lipkuns kaya, M., Biedler, J.L. & Seeger, R.C. Expression of stem cell factor and c-kit in human neuroblastoma. The Children's Cancer Group. *Blood* **84**, 3465-72 (1994).
330. Timeus, F. et al. Stem cell factor suppresses apoptosis in neuroblastoma cell lines. *Exp Hematol* **25**, 1253-60 (1997).
331. Butnor, K.J., Burchette, J.L., Sporn, T.A., Hammar, S.P. & Roggli, V.L. The spectrum of Kit (CD117) immunoreactivity in lung and pleural tumors: a study of 96 cases using a single-source antibody with a review of the literature. *Arch Pathol Lab Med* **128**, 538-43 (2004).
332. Krystal, G.W., Honsawek, S., Litz, J. & Buchdunger, E. The selective tyrosine kinase inhibitor STI571 inhibits small cell lung cancer growth. *Clin Cancer Res* **6**, 3319-26 (2000).
333. Vitali, R. et al. c-Kit is preferentially expressed in MYCN-amplified neuroblastoma and its effect on cell proliferation is inhibited in vitro by STI-571. *Int J Cancer* **106**, 147-52 (2003).
334. Hirano, K. et al. Expression of stem cell factor (SCF), a KIT ligand, in gastrointestinal stromal tumors (GISTs): a potential marker for tumor proliferation. *Pathol Res Pract* **204**, 799-807 (2008).
335. Heinrich, M.C., Blanke, C.D., Druker, B.J. & Corless, C.L. Inhibition of KIT tyrosine kinase activity: a novel molecular approach to the treatment of KIT-positive malignancies. *J Clin Oncol* **20**, 1692-703 (2002).
336. Bornkamm, G.W. Epstein-Barr virus and the pathogenesis of Burkitt's lymphoma: more questions than answers. *Int J Cancer* **124**, 1745-55 (2009).
337. Bornkamm, G.W. Epstein-Barr virus and its role in the pathogenesis of Burkitt's lymphoma: an unresolved issue. *Semin Cancer Biol* **19**, 351-65 (2009).
338. Brady, G., MacArthur, G.J. & Farrell, P.J. Epstein-Barr virus and Burkitt lymphoma. *J Clin Pathol* **60**, 1397-402 (2007).
339. Li, S., Couvillon, A.D., Brasher, B.B. & Van Etten, R.A. Tyrosine phosphorylation of Grb2 by Bcr/Abl and epidermal growth factor receptor: a novel regulatory mechanism for tyrosine kinase signaling. *Embo J* **20**, 6793-804 (2001).
340. Cross, N.C. & Reiter, A. Tyrosine kinase fusion genes in chronic myeloproliferative diseases. *Leukemia* **16**, 1207-12 (2002).
341. Mosse, Y.P., Wood, A. & Maris, J.M. Inhibition of ALK signaling for cancer therapy. *Clin Cancer Res* **15**, 5609-14 (2009).
342. Longley, B.J., Reguera, M.J. & Ma, Y. Classes of c-KIT activating mutations: proposed mechanisms of action and implications for disease classification and therapy. *Leuk Res* **25**, 571-6 (2001).
343. Lux, M.L. et al. KIT extracellular and kinase domain mutations in gastrointestinal stromal tumors. *Am J Pathol* **156**, 791-5 (2000).

344. Hirota, S. et al. Gain-of-function mutation at the extracellular domain of KIT in gastrointestinal stromal tumours. *J Pathol* **193**, 505-10 (2001).
345. Corless, C.L., Fletcher, J.A. & Heinrich, M.C. Biology of gastrointestinal stromal tumors. *J Clin Oncol* **22**, 3813-25 (2004).
346. Goemans, B.F. et al. Mutations in KIT and RAS are frequent events in pediatric core-binding factor acute myeloid leukemia. *Leukemia* **19**, 1536-42 (2005).
347. Bodemer, C. et al. Pediatric mastocytosis is a clonal disease associated with D816V and other activating c-KIT mutations. *J Invest Dermatol* **130**, 804-15.
348. Naski, M.C., Wang, Q., Xu, J. & Ornitz, D.M. Graded activation of fibroblast growth factor receptor 3 by mutations causing achondroplasia and thanatophoric dysplasia. *Nat Genet* **13**, 233-7 (1996).
349. Gilliland, D.G. & Griffin, J.D. The roles of FLT3 in hematopoiesis and leukemia. *Blood* **100**, 1532-42 (2002).
350. Stirewalt, D.L. & Radich, J.P. The role of FLT3 in haematopoietic malignancies. *Nat Rev Cancer* **3**, 650-65 (2003).
351. Meshinchi, S. & Appelbaum, F.R. Structural and functional alterations of FLT3 in acute myeloid leukemia. *Clin Cancer Res* **15**, 4263-9 (2009).
352. Hirota, S. et al. Gain-of-function mutations of c-kit in human gastrointestinal stromal tumors. *Science* **279**, 577-80 (1998).
353. Hongyo, T. et al. Specific c-kit mutations in sinonasal natural killer/T-cell lymphoma in China and Japan. *Cancer Res* **60**, 2345-7 (2000).
354. Longley, B.J., Jr. et al. Activating and dominant inactivating c-KIT catalytic domain mutations in distinct clinical forms of human mastocytosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 1609-14 (1999).
355. Fritsche-Polanz, R. et al. Mutation analysis of C-KIT in patients with myelodysplastic syndromes without mastocytosis and cases of systemic mastocytosis. *Br J Haematol* **113**, 357-64 (2001).
356. Lim, K.H. et al. Systemic mastocytosis in 342 consecutive adults: survival studies and prognostic factors. *Blood* **113**, 5727-36 (2009).
357. Mayerhofer, M. et al. Unique effects of KIT D816V in BaF3 cells: induction of cluster formation, histamine synthesis, and early mast cell differentiation antigens. *J Immunol* **180**, 5466-76 (2008).
358. Zappulla, J.P. et al. Mastocytosis in mice expressing human Kit receptor with the activating Asp816Val mutation. *J Exp Med* **202**, 1635-41 (2005).
359. Beghini, A. et al. C-kit mutations in core binding factor leukemias. *Blood* **95**, 726-7 (2000).
360. Beghini, A. et al. KIT activating mutations: incidence in adult and pediatric acute myeloid leukemia, and identification of an internal tandem duplication. *Haematologica* **89**, 920-5 (2004).
361. Cairoli, R. et al. Prognostic impact of c-KIT mutations in core binding factor leukemias: an Italian retrospective study. *Blood* **107**, 3463-8 (2006).
362. Tian, Q., Frierson, H.F., Jr., Krystal, G.W. & Moskaluk, C.A. Activating c-kit gene mutations in human germ cell tumors. *Am J Pathol* **154**, 1643-7 (1999).
363. Kemmer, K. et al. KIT mutations are common in testicular seminomas. *Am J Pathol* **164**, 305-13 (2004).
364. Looijenga, L.H. et al. Stem cell factor receptor (c-KIT) codon 816 mutations predict development of bilateral testicular germ-cell tumors. *Cancer Res* **63**, 7674-8 (2003).

365. Abella, J.V. & Park, M. Breakdown of endocytosis in the oncogenic activation of receptor tyrosine kinases. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **296**, E973-84 (2009).
366. Waterman, H. et al. A mutant EGF-receptor defective in ubiquitylation and endocytosis unveils a role for Grb2 in negative signaling. *Embo J* **21**, 303-13 (2002).
367. Peschard, P. et al. Mutation of the c-Cbl TKB domain binding site on the Met receptor tyrosine kinase converts it into a transforming protein. *Mol Cell* **8**, 995-1004 (2001).
368. Dikic, I. & Schmidt, M.H. Malfunctions within the Cbl interactome uncouple receptor tyrosine kinases from destructive transport. *Eur J Cell Biol* **86**, 505-12 (2007).
369. Sanada, M. et al. Gain-of-function of mutated C-CBL tumour suppressor in myeloid neoplasms. *Nature* **460**, 904-8 (2009).
370. Piao, X., Paulson, R., van der Geer, P., Pawson, T. & Bernstein, A. Oncogenic mutation in the Kit receptor tyrosine kinase alters substrate specificity and induces degradation of the protein tyrosine phosphatase SHP-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 14665-9 (1996).
371. Oka, T. et al. Reduction of hematopoietic cell-specific tyrosine phosphatase SHP-1 gene expression in natural killer cell lymphoma and various types of lymphomas/leukemias : combination analysis with cDNA expression array and tissue microarray. *Am J Pathol* **159**, 1495-505 (2001).
372. Oka, T. et al. Gene silencing of the tyrosine phosphatase SHP1 gene by aberrant methylation in leukemias/lymphomas. *Cancer Res* **62**, 6390-4 (2002).
373. Yang, B. et al. Epigenetic control of MAGE gene expression by the KIT tyrosine kinase. *J Invest Dermatol* **127**, 2123-8 (2007).
374. Mancini, A., Koch, A., Wilms, R. & Tamura, T. c-Cbl associates directly with the C-terminal tail of the receptor for the macrophage colony-stimulating factor, c-Fms, and down-modulates this receptor but not the viral oncogene v-Fms. *J Biol Chem* **277**, 14635-40 (2002).
375. Peschard, P. & Park, M. Escape from Cbl-mediated downregulation: a recurrent theme for oncogenic deregulation of receptor tyrosine kinases. *Cancer Cell* **3**, 519-23 (2003).
376. Toffalini, F. et al. The fusion proteins TEL-PDGFRbeta and FIP1L1-PDGFRalpha escape ubiquitination and degradation. *Haematologica* **94**, 1085-93 (2009).
377. Rao, D.S. et al. Altered receptor trafficking in Huntingtin Interacting Protein 1-transformed cells. *Cancer Cell* **3**, 471-82 (2003).
378. Jeffers, M. et al. Activating mutations for the met tyrosine kinase receptor in human cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 11445-50 (1997).
379. Yang, Y. et al. Pediatric mastocytosis-associated KIT extracellular domain mutations exhibit different functional and signaling properties compared with KIT-phosphotransferase domain mutations. *Blood*.
380. Songyang, Z. et al. Use of an oriented peptide library to determine the optimal substrates of protein kinases. *Curr Biol* **4**, 973-82 (1994).
381. Songyang, Z. et al. Catalytic specificity of protein-tyrosine kinases is critical for selective signalling. *Nature* **373**, 536-9 (1995).
382. Santoro, M. et al. Activation of RET as a dominant transforming gene by germline mutations of MEN2A and MEN2B. *Science* **267**, 381-3 (1995).

383. Liu, X. et al. Oncogenic RET receptors display different autophosphorylation sites and substrate binding specificities. *J Biol Chem* **271**, 5309-12 (1996).
384. Razumovskaya, E., Masson, K., Khan, R., Bengtsson, S. & Ronnstrand, L. Oncogenic Flt3 receptors display different specificity and kinetics of autophosphorylation. *Exp Hematol* **37**, 979-89 (2009).
385. Choudhary, C. et al. Mislocalized activation of oncogenic RTKs switches downstream signaling outcomes. *Mol Cell* **36**, 326-39 (2009).
386. Macek, B., Mann, M. & Olsen, J.V. Global and site-specific quantitative phosphoproteomics: principles and applications. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **49**, 199-221 (2009).
387. Schmidt, L. et al. Germline and somatic mutations in the tyrosine kinase domain of the MET proto-oncogene in papillary renal carcinomas. *Nat Genet* **16**, 68-73 (1997).
388. Pandit, S.D., Donis-Keller, H., Iwamoto, T., Tomich, J.M. & Pike, L.J. The multiple endocrine neoplasia type 2B point mutation alters long-term regulation and enhances the transforming capacity of the epidermal growth factor receptor. *J Biol Chem* **271**, 5850-8 (1996).
389. Santoro, M.M., Penengo, L., Orecchia, S., Cilli, M. & Gaudino, G. The Ron oncogenic activity induced by the MEN2B-like substitution overcomes the requirement for the multifunctional docking site. *Oncogene* **19**, 5208-11 (2000).
390. Xu, W., Harrison, S.C. & Eck, M.J. Three-dimensional structure of the tyrosine kinase c-Src. *Nature* **385**, 595-602 (1997).
391. Yuan, Z.L. et al. Central role of the threonine residue within the p+1 loop of receptor tyrosine kinase in STAT3 constitutive phosphorylation in metastatic cancer cells. *Mol Cell Biol* **24**, 9390-400 (2004).
392. Zermati, Y. et al. Effect of tyrosine kinase inhibitor STI571 on the kinase activity of wild-type and various mutated c-kit receptors found in mast cell neoplasms. *Oncogene* **22**, 660-4 (2003).
393. Schittenhelm, M.M. et al. Dasatinib (BMS-354825), a dual SRC/ABL kinase inhibitor, inhibits the kinase activity of wild-type, juxtamembrane, and activation loop mutant KIT isoforms associated with human malignancies. *Cancer Res* **66**, 473-81 (2006).
394. Helenius, A. & Aebi, M. Intracellular functions of N-linked glycans. *Science* **291**, 2364-9 (2001).
395. Ellgaard, L. & Helenius, A. Quality control in the endoplasmic reticulum. *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**, 181-91 (2003).
396. Ellgaard, L. & Frickel, E.M. Calnexin, calreticulin, and ERp57: teammates in glycoprotein folding. *Cell Biochem Biophys* **39**, 223-47 (2003).
397. Schroder, M. & Kaufman, R.J. The mammalian unfolded protein response. *Annu Rev Biochem* **74**, 739-89 (2005).
398. Sanders, C.R. & Myers, J.K. Disease-related misassembly of membrane proteins. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **33**, 25-51 (2004).
399. Kjaer, S. & Ibanez, C.F. Intrinsic susceptibility to misfolding of a hot-spot for Hirschsprung disease mutations in the ectodomain of RET. *Hum Mol Genet* **12**, 2133-44 (2003).
400. Kitayama, H. et al. Constitutively activating mutations of c-kit receptor tyrosine kinase confer factor-independent growth and tumorigenicity of factor-dependent hematopoietic cell lines. *Blood* **85**, 790-8 (1995).

401. Li, W. & Stanley, E.R. Role of dimerization and modification of the CSF-1 receptor in its activation and internalization during the CSF-1 response. *Embo J* **10**, 277-88 (1991).
402. Lievens, P.M. & Liboi, E. The thanatophoric dysplasia type II mutation hampers complete maturation of fibroblast growth factor receptor 3 (FGFR3), which activates signal transducer and activator of transcription 1 (STAT1) from the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* **278**, 17344-9 (2003).
403. Lievens, P.M., Mutinelli, C., Baynes, D. & Liboi, E. The kinase activity of fibroblast growth factor receptor 3 with activation loop mutations affects receptor trafficking and signaling. *J Biol Chem* **279**, 43254-60 (2004).
404. Bougherara, H. et al. The aberrant localization of oncogenic kit tyrosine kinase receptor mutants is reversed on specific inhibitory treatment. *Mol Cancer Res* **7**, 1525-33 (2009).
405. Tabone-Eglinger, S. et al. KIT mutations induce intracellular retention and activation of an immature form of the KIT protein in gastrointestinal stromal tumors. *Clin Cancer Res* **14**, 2285-94 (2008).
406. Frangioni, J.V., Beahm, P.H., Shifrin, V., Jost, C.A. & Neel, B.G. The nontransmembrane tyrosine phosphatase PTP-1B localizes to the endoplasmic reticulum via its 35 amino acid C-terminal sequence. *Cell* **68**, 545-60 (1992).
407. Charest, A. et al. Oncogenic targeting of an activated tyrosine kinase to the Golgi apparatus in a glioblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 916-21 (2003).
408. Xiang, Z., Kreisel, F., Cain, J., Colson, A. & Tomasson, M.H. Neoplasia driven by mutant c-KIT is mediated by intracellular, not plasma membrane, receptor signaling. *Mol Cell Biol* **27**, 267-82 (2007).
409. Schmidt-Arras, D. et al. Anchoring of FLT3 in the endoplasmic reticulum alters signaling quality. *Blood* **113**, 3568-76 (2009).
410. Voisset, E., Lopez, S., Dubreuil, P. & De Sepulveda, P. The tyrosine kinase FES is an essential effector of KITD816V proliferation signal. *Blood* **110**, 2593-9 (2007).
411. Sun, J., Pedersen, M. & Ronnstrand, L. The D816V mutation of c-Kit circumvents a requirement for Src family kinases in c-Kit signal transduction. *J Biol Chem* **284**, 11039-47 (2009).
412. Mizuki, M. et al. Suppression of myeloid transcription factors and induction of STAT response genes by AML-specific Flt3 mutations. *Blood* **101**, 3164-73 (2003).
413. Kano, F., Sako, Y., Tagaya, M., Yanagida, T. & Murata, M. Reconstitution of brefeldin A-induced golgi tubulation and fusion with the endoplasmic reticulum in semi-intact chinese hamster ovary cells. *Mol Biol Cell* **11**, 3073-87 (2000).
414. Lievens, P.M., Roncador, A. & Liboi, E. K644E/M FGFR3 mutants activate Erk1/2 from the endoplasmic reticulum through FRS2 alpha and PLC gamma-independent pathways. *J Mol Biol* **357**, 783-92 (2006).
415. Chian, R. et al. Phosphatidylinositol 3 kinase contributes to the transformation of hematopoietic cells by the D816V c-Kit mutant. *Blood* **98**, 1365-73 (2001).
416. Hashimoto, K. et al. Necessity of tyrosine 719 and phosphatidylinositol 3'-kinase-mediated signal pathway in constitutive activation and oncogenic potential of c-kit receptor tyrosine kinase with the Asp814Val mutation. *Blood* **101**, 1094-102 (2003).

417. Voisset, E. et al. FES kinase participates in KIT-ligand induced chemotaxis. *Biochem Biophys Res Commun* **393**, 174-8.
418. Zhang, S. et al. Essential role of signal transducer and activator of transcription (Stat)5a but not Stat5b for Flt3-dependent signaling. *J Exp Med* **192**, 719-28 (2000).
419. Rocnik, J.L. et al. Roles of tyrosine 589 and 591 in STAT5 activation and transformation mediated by FLT3-ITD. *Blood* **108**, 1339-45 (2006).
420. Choudhary, C. et al. Activation mechanisms of STAT5 by oncogenic Flt3-ITD. *Blood* **110**, 370-4 (2007).
421. Weinstein, I.B. Cancer. Addiction to oncogenes--the Achilles heel of cancer. *Science* **297**, 63-4 (2002).
422. Schindler, C., Levy, D.E. & Decker, T. JAK-STAT signaling: from interferons to cytokines. *J Biol Chem* **282**, 20059-63 (2007).
423. Darnell, J.E., Jr., Kerr, I.M. & Stark, G.R. Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. *Science* **264**, 1415-21 (1994).
424. McWhinney, C.D., Dostal, D. & Baker, K. Angiotensin II activates Stat5 through Jak2 kinase in cardiac myocytes. *J Mol Cell Cardiol* **30**, 751-61 (1998).
425. Wong, M. & Fish, E.N. RANTES and MIP-1alpha activate stats in T cells. *J Biol Chem* **273**, 309-14 (1998).
426. Olayioye, M.A., Beuvink, I., Horsch, K., Daly, J.M. & Hynes, N.E. ErbB receptor-induced activation of stat transcription factors is mediated by Src tyrosine kinases. *J Biol Chem* **274**, 17209-18 (1999).
427. Storz, P., Doppler, H., Pfizenmaier, K. & Muller, G. Insulin selectively activates STAT5b, but not STAT5a, via a JAK2-independent signalling pathway in Kym-1 rhabdomyosarcoma cells. *FEBS Lett* **464**, 159-63 (1999).
428. Vignais, M.L. & Gilman, M. Distinct mechanisms of activation of Stat1 and Stat3 by platelet-derived growth factor receptor in a cell-free system. *Mol Cell Biol* **19**, 3727-35 (1999).
429. Mao, X. & Chen, X. Crystallization and X-ray crystallographic analysis of human STAT1. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun* **61**, 666-8 (2005).
430. Wenta, N., Strauss, H., Meyer, S. & Vinkemeier, U. Tyrosine phosphorylation regulates the partitioning of STAT1 between different dimer conformations. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 9238-43 (2008).
431. Lackmann, M. et al. Biomolecular interaction analysis of IFN gamma-induced signaling events in whole-cell lysates: prevalence of latent STAT1 in high-molecular weight complexes. *Growth Factors* **16**, 39-51 (1998).
432. Sehgal, P.B. STAT-signalling through the cytoplasmic compartment: consideration of a new paradigm. *Cell Signal* **12**, 525-35 (2000).
433. Reich, N.C. & Liu, L. Tracking STAT nuclear traffic. *Nat Rev Immunol* **6**, 602-12 (2006).
434. Malakhova, O.A. et al. Protein ISGylation modulates the JAK-STAT signaling pathway. *Genes Dev* **17**, 455-60 (2003).
435. Ungureanu, D., Vanhatupa, S., Gronholm, J., Palvimo, J.J. & Silvennoinen, O. SUMO-1 conjugation selectively modulates STAT1-mediated gene responses. *Blood* **106**, 224-6 (2005).

436. Lim, C.P. & Cao, X. Structure, function, and regulation of STAT proteins. *Mol Biosyst* **2**, 536-50 (2006).
437. Wen, Z., Zhong, Z. & Darnell, J.E., Jr. Maximal activation of transcription by Stat1 and Stat3 requires both tyrosine and serine phosphorylation. *Cell* **82**, 241-50 (1995).
438. Park, S.H., Yamashita, H., Rui, H. & Waxman, D.J. Serine phosphorylation of GH-activated signal transducer and activator of transcription 5a (STAT5a) and STAT5b: impact on STAT5 transcriptional activity. *Mol Endocrinol* **15**, 2157-71 (2001).
439. Yamashita, H. et al. Role of serine phosphorylation of Stat5a in prolactin-stimulated beta-casein gene expression. *Mol Cell Endocrinol* **183**, 151-63 (2001).
440. Shen, Y. et al. Essential role of STAT3 in postnatal survival and growth revealed by mice lacking STAT3 serine 727 phosphorylation. *Mol Cell Biol* **24**, 407-19 (2004).
441. Varinou, L. et al. Phosphorylation of the Stat1 transactivation domain is required for full-fledged IFN-gamma-dependent innate immunity. *Immunity* **19**, 793-802 (2003).
442. Sadzak, I. et al. Recruitment of Stat1 to chromatin is required for interferon-induced serine phosphorylation of Stat1 transactivation domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 8944-9 (2008).
443. Decker, T. & Kovarik, P. Serine phosphorylation of STATs. *Oncogene* **19**, 2628-37 (2000).
444. Espert, L., Dusanter-Fourt, I. & Chelbi-Alix, M.K. [Negative regulation of the JAK/STAT: pathway implication in tumorigenesis]. *Bull Cancer* **92**, 845-57 (2005).
445. Alexander, W.S. Suppressors of cytokine signalling (SOCS) in the immune system. *Nat Rev Immunol* **2**, 410-6 (2002).
446. Takeda, K. et al. Targeted disruption of the mouse Stat3 gene leads to early embryonic lethality. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 3801-4 (1997).
447. Miyoshi, K. et al. Signal transducer and activator of transcription (Stat) 5 controls the proliferation and differentiation of mammary alveolar epithelium. *J Cell Biol* **155**, 531-42 (2001).
448. Bunting, K.D. et al. Reduced lymphomyeloid repopulating activity from adult bone marrow and fetal liver of mice lacking expression of STAT5. *Blood* **99**, 479-87 (2002).
449. Shelburne, C.P. et al. Stat5: an essential regulator of mast cell biology. *Mol Immunol* **38**, 1187-91 (2002).
450. Durbin, J.E., Hackenmiller, R., Simon, M.C. & Levy, D.E. Targeted disruption of the mouse Stat1 gene results in compromised innate immunity to viral disease. *Cell* **84**, 443-50 (1996).
451. Lesinski, G.B. et al. The antitumor effects of IFN-alpha are abrogated in a STAT1-deficient mouse. *J Clin Invest* **112**, 170-80 (2003).
452. Paukku, K. & Silvennoinen, O. STATs as critical mediators of signal transduction and transcription: lessons learned from STAT5. *Cytokine Growth Factor Rev* **15**, 435-55 (2004).
453. Kidder, B.L., Yang, J. & Palmer, S. Stat3 and c-Myc genome-wide promoter occupancy in embryonic stem cells. *PLoS One* **3**, e3932 (2008).

454. Wegrzyn, J. et al. Function of mitochondrial Stat3 in cellular respiration. *Science* **323**, 793-7 (2009).
455. Gough, D.J. et al. Mitochondrial STAT3 supports Ras-dependent oncogenic transformation. *Science* **324**, 1713-6 (2009).
456. Reich, N.C. STAT3 revs up the powerhouse. *Sci Signal* **2**, pe61 (2009).
457. Kira, M. et al. STAT3 deficiency in keratinocytes leads to compromised cell migration through hyperphosphorylation of p130(cas). *J Biol Chem* **277**, 12931-6 (2002).
458. Silver, D.L., Naora, H., Liu, J., Cheng, W. & Montell, D.J. Activated signal transducer and activator of transcription (STAT) 3: localization in focal adhesions and function in ovarian cancer cell motility. *Cancer Res* **64**, 3550-8 (2004).
459. Ng, D.C. et al. Stat3 regulates microtubules by antagonizing the depolymerization activity of stathmin. *J Cell Biol* **172**, 245-57 (2006).
460. Verma, N.K. et al. STAT3-stathmin interactions control microtubule dynamics in migrating T-cells. *J Biol Chem* **284**, 12349-62 (2009).
461. Gao, S.P. & Bromberg, J.F. Touched and moved by STAT3. *Sci STKE* **2006**, pe30 (2006).
462. Yang, J. et al. Unphosphorylated STAT3 accumulates in response to IL-6 and activates transcription by binding to NFkappaB. *Genes Dev* **21**, 1396-408 (2007).
463. Yang, J. & Stark, G.R. Roles of unphosphorylated STATs in signaling. *Cell Res* **18**, 443-51 (2008).
464. Harrison, D.A., Binari, R., Nahreini, T.S., Gilman, M. & Perrimon, N. Activation of a Drosophila Janus kinase (JAK) causes hematopoietic neoplasia and developmental defects. *Embo J* **14**, 2857-65 (1995).
465. Luo, H., Hanratty, W.P. & Dearolf, C.R. An amino acid substitution in the Drosophila hopTum-I Jak kinase causes leukemia-like hematopoietic defects. *Embo J* **14**, 1412-20 (1995).
466. Hanratty, W.P. & Dearolf, C.R. The Drosophila Tumorous-lethal hematopoietic oncogene is a dominant mutation in the hopscotch locus. *Mol Gen Genet* **238**, 33-7 (1993).
467. Yu, C.L. et al. Enhanced DNA-binding activity of a Stat3-related protein in cells transformed by the Src oncoprotein. *Science* **269**, 81-3 (1995).
468. Bromberg, J.F., Horvath, C.M., Besser, D., Lathem, W.W. & Darnell, J.E., Jr. Stat3 activation is required for cellular transformation by v-src. *Mol Cell Biol* **18**, 2553-8 (1998).
469. Turkson, J. et al. Stat3 activation by Src induces specific gene regulation and is required for cell transformation. *Mol Cell Biol* **18**, 2545-52 (1998).
470. Bowman, T., Garcia, R., Turkson, J. & Jove, R. STATs in oncogenesis. *Oncogene* **19**, 2474-88 (2000).
471. Quesnelle, K.M., Boehm, A.L. & Grandis, J.R. STAT-mediated EGFR signaling in cancer. *J Cell Biochem* **102**, 311-9 (2007).
472. Benekli, M., Baer, M.R., Baumann, H. & Wetzler, M. Signal transducer and activator of transcription proteins in leukemias. *Blood* **101**, 2940-54 (2003).
473. Yu, H. & Jove, R. The STATs of cancer--new molecular targets come of age. *Nat Rev Cancer* **4**, 97-105 (2004).
474. Kim, H.S. & Lee, M.S. STAT1 as a key modulator of cell death. *Cell Signal* **19**, 454-65 (2007).

475. Kovacic, B. et al. STAT1 acts as a tumor promoter for leukemia development. *Cancer Cell* **10**, 77-87 (2006).
476. Rocnik, J.L. & Gilliland, D.G. Cell-autonomous and -nonautonomous contributions of STAT1 in murine models of tumorigenesis. *Cancer Cell* **10**, 1-2 (2006).
477. Yu, H., Pardoll, D. & Jove, R. STATs in cancer inflammation and immunity: a leading role for STAT3. *Nat Rev Cancer* **9**, 798-809 (2009).
478. Darnell, J.E., Jr. Transcription factors as targets for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* **2**, 740-9 (2002).
479. Buettner, R., Mora, L.B. & Jove, R. Activated STAT signaling in human tumors provides novel molecular targets for therapeutic intervention. *Clin Cancer Res* **8**, 945-54 (2002).
480. Benekli, M., Baumann, H. & Wetzler, M. Targeting signal transducer and activator of transcription signaling pathway in leukemias. *J Clin Oncol* **27**, 4422-32 (2009).
481. Turkson, J. et al. Phosphotyrosyl peptides block Stat3-mediated DNA binding activity, gene regulation, and cell transformation. *J Biol Chem* **276**, 45443-55 (2001).
482. Turkson, J. et al. Inhibition of constitutive signal transducer and activator of transcription 3 activation by novel platinum complexes with potent antitumor activity. *Mol Cancer Ther* **3**, 1533-42 (2004).
483. Ning, Z.Q., Li, J. & Arceci, R.J. Signal transducer and activator of transcription 3 activation is required for Asp(816) mutant c-Kit-mediated cytokine-independent survival and proliferation in human leukemia cells. *Blood* **97**, 3559-67 (2001).
484. Harir, N. et al. Oncogenic Kit controls neoplastic mast cell growth through a Stat5/PI3-kinase signaling cascade. *Blood* **112**, 2463-73 (2008).
485. Simon, C. et al. Lnk adaptor protein down-regulates specific Kit-induced signaling pathways in primary mast cells. *Blood* **112**, 4039-47 (2008).
486. Takaki, S. et al. Control of B cell production by the adaptor protein Lnk. Definition Of a conserved family of signal-modulating proteins. *Immunity* **13**, 599-609 (2000).
487. Agosti, V., Karur, V., Sathyanarayana, P., Besmer, P. & Wojchowski, D.M. A KIT juxtamembrane PY567 -directed pathway provides nonredundant signals for erythroid progenitor cell development and stress erythropoiesis. *Exp Hematol* **37**, 159-71 (2009).
488. Butterfield, J.H., Weiler, D., Dewald, G. & Gleich, G.J. Establishment of an immature mast cell line from a patient with mast cell leukemia. *Leuk Res* **12**, 345-55 (1988).
489. Furitsu, T. et al. Identification of mutations in the coding sequence of the proto-oncogene c-kit in a human mast cell leukemia cell line causing ligand-independent activation of c-kit product. *J Clin Invest* **92**, 1736-44 (1993).
490. Yu, W. et al. Abi1 gene silencing by short hairpin RNA impairs Bcr-Abl-induced cell adhesion and migration in vitro and leukemogenesis in vivo. *Carcinogenesis* **29**, 1717-24 (2008).
491. Kimura, S. et al. NS-187, a potent and selective dual Bcr-Abl/Lyn tyrosine kinase inhibitor, is a novel agent for imatinib-resistant leukemia. *Blood* **106**, 3948-54 (2005).

492. Chen, J. et al. Stable expression of small interfering RNA sensitizes TEL-PDGFBetaR to inhibition with imatinib or rapamycin. *J Clin Invest* **113**, 1784-91 (2004).
493. Takaki, S., Morita, H., Tezuka, Y. & Takatsu, K. Enhanced hematopoiesis by hematopoietic progenitor cells lacking intracellular adaptor protein, Lnk. *J Exp Med* **195**, 151-60 (2002).
494. Sattler, M. et al. Steel factor induces tyrosine phosphorylation of CRKL and binding of CRKL to a complex containing c-kit, phosphatidylinositol 3-kinase, and p120(CBL). *J Biol Chem* **272**, 10248-53 (1997).
495. Vogelstein, B. & Kinzler, K.W. Cancer genes and the pathways they control. *Nat Med* **10**, 789-99 (2004).
496. Sharpless, N.E. & Depinho, R.A. The mighty mouse: genetically engineered mouse models in cancer drug development. *Nat Rev Drug Discov* **5**, 741-54 (2006).
497. Gutmann, D.H., Hunter-Schaedle, K. & Shannon, K.M. Harnessing preclinical mouse models to inform human clinical cancer trials. *J Clin Invest* **116**, 847-52 (2006).
498. Moody, S.E. et al. Conditional activation of Neu in the mammary epithelium of transgenic mice results in reversible pulmonary metastasis. *Cancer Cell* **2**, 451-61 (2002).
499. Gunther, E.J. et al. Impact of p53 loss on reversal and recurrence of conditional Wnt-induced tumorigenesis. *Genes Dev* **17**, 488-501 (2003).
500. Huettner, C.S., Zhang, P., Van Etten, R.A. & Tenen, D.G. Reversibility of acute B-cell leukaemia induced by BCR-ABL1. *Nat Genet* **24**, 57-60 (2000).
501. Fisher, G.H. et al. Induction and apoptotic regression of lung adenocarcinomas by regulation of a K-Ras transgene in the presence and absence of tumor suppressor genes. *Genes Dev* **15**, 3249-62 (2001).
502. Felsher, D.W. & Bishop, J.M. Reversible tumorigenesis by MYC in hematopoietic lineages. *Mol Cell* **4**, 199-207 (1999).
503. Jain, M. et al. Sustained loss of a neoplastic phenotype by brief inactivation of MYC. *Science* **297**, 102-4 (2002).
504. Shachaf, C.M. et al. MYC inactivation uncovers pluripotent differentiation and tumour dormancy in hepatocellular cancer. *Nature* **431**, 1112-7 (2004).
505. Felsher, D.W. Cancer revoked: oncogenes as therapeutic targets. *Nat Rev Cancer* **3**, 375-80 (2003).
506. Druker, B.J. et al. Effects of a selective inhibitor of the Abl tyrosine kinase on the growth of Bcr-Abl positive cells. *Nat Med* **2**, 561-6 (1996).
507. Heinrich, M.C. et al. Inhibition of c-kit receptor tyrosine kinase activity by STI 571, a selective tyrosine kinase inhibitor. *Blood* **96**, 925-32 (2000).
508. Joensuu, H. et al. Effect of the tyrosine kinase inhibitor STI571 in a patient with a metastatic gastrointestinal stromal tumor. *N Engl J Med* **344**, 1052-6 (2001).
509. Cassier, P.A. et al. Imatinib mesilate for the treatment of gastrointestinal stromal tumour. *Expert Opin Pharmacother* **9**, 1211-22 (2008).
510. Hoffmann, K.M. et al. Successful treatment of progressive cutaneous mastocytosis with imatinib in a 2-year-old boy carrying a somatic KIT mutation. *Blood* **112**, 1655-7 (2008).
511. Frost, M.J., Ferrao, P.T., Hughes, T.P. & Ashman, L.K. Juxtamembrane mutant V560GKit is more sensitive to Imatinib (STI571) compared with wild-

- type c-kit whereas the kinase domain mutant D816VKit is resistant. *Mol Cancer Ther* **1**, 1115-24 (2002).
512. Gajiwala, K.S. et al. KIT kinase mutants show unique mechanisms of drug resistance to imatinib and sunitinib in gastrointestinal stromal tumor patients. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 1542-7 (2009).
513. Verstovsek, S. et al. Phase II study of dasatinib in Philadelphia chromosome-negative acute and chronic myeloid diseases, including systemic mastocytosis. *Clin Cancer Res* **14**, 3906-15 (2008).
514. Emens, L.A. Trastuzumab: targeted therapy for the management of HER-2/neu-overexpressing metastatic breast cancer. *Am J Ther* **12**, 243-53 (2005).
515. Heinrich, M.C. et al. Molecular correlates of imatinib resistance in gastrointestinal stromal tumors. *J Clin Oncol* **24**, 4764-74 (2006).
516. Tamborini, E. et al. Functional analyses and molecular modeling of two c-Kit mutations responsible for imatinib secondary resistance in GIST patients. *Oncogene* **25**, 6140-6 (2006).
517. Maleddu, A. et al. Mechanisms of secondary resistance to tyrosine kinase inhibitors in gastrointestinal stromal tumours (Review). *Oncol Rep* **21**, 1359-66 (2009).
518. Esteva, F.J., Yu, D., Hung, M.C. & Hortobagyi, G.N. Molecular predictors of response to trastuzumab and lapatinib in breast cancer. *Nat Rev Clin Oncol* **7**, 98-107.
519. Ferrer-Soler, L. et al. An update of the mechanisms of resistance to EGFR-tyrosine kinase inhibitors in breast cancer: Gefitinib (Iressa) -induced changes in the expression and nucleo-cytoplasmic trafficking of HER-ligands (Review). *Int J Mol Med* **20**, 3-10 (2007).
520. Klinken, D.J., 2nd. Signal transduction networks in cancer: quantitative parameters influence network topology. *Cancer Res* **70**, 1773-82.
521. Weinstein, I.B. & Joe, A.K. Mechanisms of disease: Oncogene addiction--a rationale for molecular targeting in cancer therapy. *Nat Clin Pract Oncol* **3**, 448-57 (2006).
522. Felsher, D.W. Oncogene addiction versus oncogene amnesia: perhaps more than just a bad habit? *Cancer Res* **68**, 3081-6; discussion 3086 (2008).
523. Rosen, J.M. & Jordan, C.T. The increasing complexity of the cancer stem cell paradigm. *Science* **324**, 1670-3 (2009).
524. Leonart, M.E., Artero-Castro, A. & Kondoh, H. Senescence induction; a possible cancer therapy. *Mol Cancer* **8**, 3 (2009).
525. Evan, G.I. & d'Adda di Fagagna, F. Cellular senescence: hot or what? *Curr Opin Genet Dev* **19**, 25-31 (2009).
526. Ohtani, N., Mann, D.J. & Hara, E. Cellular senescence: its role in tumor suppression and aging. *Cancer Sci* **100**, 792-7 (2009).
527. Collado, M. & Serrano, M. Senescence in tumours: evidence from mice and humans. *Nat Rev Cancer* **10**, 51-7.
528. Bishop, J.M. Molecular themes in oncogenesis. *Cell* **64**, 235-48 (1991).
529. Lowe, S.W., Cepero, E. & Evan, G. Intrinsic tumour suppression. *Nature* **432**, 307-15 (2004).
530. Giuriato, S. et al. Sustained regression of tumors upon MYC inactivation requires p53 or thrombospondin-1 to reverse the angiogenic switch. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 16266-71 (2006).

531. Bhardwaj, N. Harnessing the immune system to treat cancer. *J Clin Invest* **117**, 1130-6 (2007).
532. Mougiakakos, D., Choudhury, A., Lladser, A., Kiessling, R. & Johansson, C.C. Regulatory T cells in cancer. *Adv Cancer Res* **107**, 57-117.

## Normal and oncogenic signalling of the receptor tyrosine kinase KIT

The receptor tyrosine kinase KIT and its ligand, the stem cell factor (SCF), are implicated both in the development and the homeostasis of multiple cell lineages. Dysfunctions in the KIT/SCF pathway are involved in several pathologies affecting these compartments. In particular, gain-of-function mutations that lead to constitutive activation of the receptor KIT are found in human neoplasia.

The purpose of this thesis project was to investigate some differences between normal and oncogenic signalling of KIT receptor using mast cells transformed by the KIT-D816 oncogene as a model. This question was analysed at a proximal level on the oncogenic receptor itself and at a more distal level on the STAT signal transduction pathway, which is specifically and constitutively activated by the KIT-D816 mutant.

At the proximal level, we show that the juxtamembrane dityrosine motif Y568-Y570 of KIT is the major platform of recruitment of intracellular signalling partners with more than 15 interactors found in mast cells. Furthermore, the analysis of cellular models in both *in vitro* and *in vivo* assays related to KIT physiological functions has revealed the negative role of the motif in KIT-D816-mediated cell transformation.

At the distal level, we have analysed the mechanisms of phosphorylation of STAT1, -3 and -5 proteins and the functional relevance of their activation in KIT-D816-mediated transformation. We describe the contribution of different kinases in the phosphorylation of STATs on both serine and tyrosine residues. Our results suggest that only STAT5 is transcriptionally active whereas STAT1 and STAT3 are not, suggesting a non conventional implication of their activation in cell transformation.

Our work contributes to a better understanding of the mechanisms of KIT-D816-mediated oncogenesis and could be used to improve the rational development of new targeted cancer therapies

### KEYWORDS

Oncogene, Cellular transformation, Mastocytosis, Leukaemia, Protein kinases, STAT.

## **Les spécificités de la signalisation oncogénique par rapport à la signalisation physiologique : le modèle de KIT, un récepteur à activité tyrosine kinase.**

Le système de communication SCF/KIT est impliqué dans le développement et l'homéostasie de plusieurs lignages cellulaires. Des dysfonctionnements de la voie sont à l'origine de pathologies affectant ces compartiments. En particulier, des mutations gain-de-fonction, qui entraînent l'activation constitutive du récepteur à activité tyrosine kinase KIT, sont responsables de néoplasies chez l'homme.

L'objectif des travaux réalisés durant cette thèse était d'étudier certaines spécificités de la signalisation de formes oncogéniques de KIT, ceci dans le modèle du mastocyte transformé par l'oncogène KIT-D816V. Cette étude a été menée au niveau proximal sur le récepteur lui-même ainsi qu'au niveau distal sur la voie STAT, une des voies de signalisation spécifiquement activée de manière constitutive par le récepteur mutant.

Au niveau proximal, nous avons pu montrer que le motif dityrosine Y568-Y570 situé dans le domaine juxtamembranaire de hKIT est une plateforme majeure de recrutement des effecteurs de la signalisation intracellulaire avec au moins 15 partenaires différents recrutées. Par ailleurs l'étude de modèles cellulaires dans des analyses liées aux fonctions physiologiques du récepteur réalisés *in vitro* et *in vivo* ont révélé que le site est impliqué dans la régulation négative du signal transformant issu de l'oncogène KIT-D816.

Au niveau distal, nous avons analysé les mécanismes de phosphorylation des protéines STAT1, -3 et -5 ainsi que l'importance fonctionnelle de leur activation dans la transformation dépendante de KIT-D816. Nous avons ainsi étudié la contribution de différentes kinases dans les phosphorylations activatrices des STATs sur tyrosine et serine. Nos résultats suggèrent que seul STAT5 a une activité transcriptionnelle dans nos modèles suggérant une implication potentielle non canonique des STAT1 et -3 dans la transformation dépendante de KIT-D816.

L'ensemble de nos travaux contribue à une meilleure compréhension des mécanismes de l'oncogenèse dépendante de KIT-D816, un point critique dans le développement raisonné de thérapies anticancéreuses ciblées.

### **MOTS-CLES**

Oncogène, Transformation cellulaire, Mastocytose, Leucémie, Protéine kinase, STAT.

### **DISCIPLINE**

BIOLOGIE DES EUCARYOTES spécialité IMMUNOLOGIE

### **LABORATOIRE**

**Centre de Recherche en Cancérologie de Marseille (CRCM)**

INSERM U891, Institut Paoli-Calmettes, IFR 137,

27, boulevard Lei Roure BP 30059 13273 Marseille Cedex 09 France