

UNIVERSITE PARIS 13 NORD
UFR de SANTE, MEDECINE et BIOLOGIE HUMAINE

ECOLE DOCTORALE GALILEE

THESE

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE PARIS 13

Discipline : Biologie Cellulaire et Moléculaire

Déterminants fonctionnels du proto-oncogène Vav1 et expression physiopathologique

présentée et soutenue publiquement par

Lyra RAZANADRAKOTO - RANDZAVOLA

le 10 Septembre 2013

MEMBRES DU JURY :

Pr. Carole PLANES
Pr. Michel VIDAL
Dr. Gordon LANGSLEY
Pr. Shulamit KATZAV
Dr. Nadine VARIN BLANK

Présidente
Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Directrice de Thèse

Thèse réalisée dans le Laboratoire Adaptateurs et Signalisation en Hématologie (ASIH)

Remerciements

Mes premiers remerciements vont aux honorables membres de mon jury de thèse : le Pr. Carole PLANES qui a accepté de présider ce jury ; le Pr. Michel VIDAL et le Dr. Gordon LANGSLEY, pour le temps qu'ils ont consacré à la lecture de ce manuscrit et à la rédaction des rapports de thèse ; le Pr. Shulamit KATZAV qui s'est déplacée d'Israël et m'a fait l'immense honneur d'accepter de faire partie de ce jury.

Dr. Nadine VARIN-BLANK, ma chère Directrice de Thèse, je pense que les mots ne seront pas suffisants, pour vous exprimer toute ma gratitude. Grâce à vous, les 8570 km qui me séparent de ma famille et de mon pays ainsi que tous mes sacrifices n'ont pas été vains. Vous m'avez appris le « b.a.-ba » de la biologie cellulaire et moléculaire. Vous m'avez transmis la passion de la recherche et la motivation de continuer dans ce métier. Merci Nadine.

Je tiens à remercier sincèrement le Dr. Lionel GUITTAT, le Dr. Elisabetta DONDI, le Dr. Françoise CORMIER et le Dr. Laura GARDANO, qui ont été d'un soutien précieux durant cette thèse. Je remercie également tous les autres membres de mon laboratoire et en particulier les chercheurs avec lesquels j'ai collaboré. Pour n'en oublier aucun, je ne vais pas vous citer mais sachez que ce fut un réel plaisir et une chance d'avoir travaillé avec vous.

Hajer, Stéphane et Vanessa, merci pour votre amitié, votre écoute et votre soutien. Je vous souhaite à vous, et à tous les autres, Maude, Elodie, Lamia, de boucler avec succès vos thèses respectives. Je n'oublie pas nos aînés, Mohand, Inès, Laurent pour avoir montré l'exemple...

Je remercie les techniciens et les techniciennes du Laboratoire de Biochimie et du Laboratoire d'Hématologie de l'Hôpital Avicenne, pour m'avoir accueilli dans leurs locaux et m'avoir donné accès à leurs matériels.

Je remercie la Fondation Recherche Médicale pour le soutien financier qu'elle m'a offert et qui m'a permis de boucler la fin de cette thèse.

Merci à mon mari adoré qui a toujours été là pour moi. Je n'oublie pas mes formidables proches : mes parents, mes sœurs et mon frère, la famille POULIQUEN, la famille ANDRIAMANANTSARA, mes chéries Lalaina et Ny Voahary, mes copines Julia, Adeline, Alexia. Merci à tous.

J'ai une pensée particulière pour le Pr Adolphe RANDRIANTSOA, auquel j'adresse mes profonds remerciements pour m'avoir appuyée dans toutes mes démarches pour venir étudier en France. Et je remercie tous mes amis de la promotion 2006-2007 de pharmacologie de l'Université d'Antananarivo Madagascar.

Tables des Matières

INTRODUCTION	12
PARTIE I : LES PROTAGONISTES DE LA TRANSFORMATION CELLULAIRE	13
1 La signalisation dépendante des GTPases et le remaniement du cytosquelette	13
1.1 Les principales familles de GTPases	13
1.2 Base structurale des GTPases	15
1.3 Principe de la réaction d'échange et modification conformationnelle associée	16
1.4 Régulateurs des GTPases.	17
1.5 Fonctions physiologiques des GTPases : cas de la famille Rho	18
1.5.1 Réorganisation du cytosquelette	19
1.5.2 Autres activations cellulaires	20
1.6 Activation des Rho GTPases dans les pathologies	21
2 Les jonctions d'adhérence et l'inhibition de contact	23
2.1 Les cadhérines	24
2.2 Les caténines	24
2.2.1 α -caténine	24
2.2.2 β -caténine	25
2.2.3 p120-caténine	25
2.3 Rôle des différents composants au sein du complexe d'adhérence	25
2.4 Modulation des jonctions cellulaires par les Rho GTPases	26
2.4.1 Modulation par RhoA	26
2.4.2 Modulation par Rac1/Cdc42	27
3 Exemple de voies de phosphorylation impliquées dans la transformation	28
3.1 La voie JNK/p38	28
3.1.1 Les acteurs de la voie	28
3.1.2 Contexte physiologique	30
3.1.3 Implications pathologiques	30
3.2 La voie Wnt/ β -caténine	31
3.2.1 Implication physiologique	31
3.2.2 Contexte pathologique	32
PARTIE II : LE PROTO-ONCOGENE VAV1.	33
1 Les membres de la famille Vav et expression tissulaire	33
2 Structure de la protéine Vav1	34
3 Principales fonctions	36
3.1 Fonction de facteur d'échange du GDP/GTP	37
3.1.1 Les substrats de Vav	37

3.1.2	Spécificité et base structurale de la réaction d'échange	38
3.2	Fonction adaptatrice	40
3.2.1	Spécificité du domaine SH2	40
3.2.2	Spécificité du domaine SH3	40
4	Partenaires fonctionnels de Vav1 et adressage subcellulaire	41
4.1	Exemple de récepteurs activateurs et recrutement à la membrane	41
4.1.1	Les récepteurs immuns	41
4.1.2	Les récepteurs aux facteurs de croissance	42
4.1.3	Les récepteurs à activité tyrosine kinase	43
4.2	Exemples de partenaires et effecteurs cytoplasmiques	43
4.3	Exemple de partenaires nucléaires et adressage au noyau	44
5	Modulation fonctionnelle de Vav1	45
5.1	Rôle de la phosphorylation et du changement de conformation dans l'activation de Vav1	45
5.2	Régulation négative des fonctions de Vav1	47
6	Relevance physiologique de Vav1	49
6.1	Un acteur clé dans la signalisation lymphocytaire	49
6.1.1	Rôle sur la formation de la synapse immunologique	49
6.1.2	Signalisation en réponse à la stimulation antigénique	52
6.1.2.1	Régulation du flux calcique	52
6.1.2.2	Modulation des voies MAPK	53
6.1.2.3	Activation de facteurs de transcription	54
6.1.2.4	Expression génique : exemple du gène de l'IL2 impliqué dans la prolifération	57
6.2	Importance physiologique : les souris invalidées	57
7	Relevance pathologique de Vav1	59
7.1	Implication dans les hémopathies : les modèles murins	60
7.2	Anomalies dans le système hématopoïétique	61
PARTIE III : L'ONCOGENE VAV1 ET SON EXPRESSION ECTOPIQUE		63
1	Caractérisation de formes oncogéniques de Vav1	63
1.1	Mise en évidence de formes oncogéniques de Vav1	63
1.2	Mise en évidence de formes oncogéniques de Vav2 et Vav3	65
1.3	Régulation de la capacité transformante	65
1.3.1	Rôle de l'extrémité amino-terminale	65
1.3.2	Rôle des domaines SH	65
1.3.3	Contribution des domaines PH/CRD	66
2	Rôle émergent des protéines Vav dans le cancer	67
2.1	Vav2 et cancer	68
2.1.1	Expression de Vav2 dans les mélanomes	68

2.1.2	Expression dans les carcinomes	68
2.2	Vav3 et cancer	69
2.3	Rôle de Vav2 et Vav3 dans la tumorigenèse et le processus métastique	69
2.3.1	Néo-angiogenèse tumorale	69
2.3.2	Tumorigenèse et métastase	70
3	Expression de Vav1 dans des cellules non hématopoïétiques et cancers	71
3.1	Expression de Vav1 dans les neuroblastomes	71
3.2	Expression de Vav1 dans les adénocarcinomes pancréatiques	71
3.3	Expression de Vav1 dans le cancer du poumon	72
3.4	Expression de Vav1 dans le cancer du sein	72
RESULTATS		77
PROBLEMATIQUE ET PRESENTATION DU SYSTEME		78
Article: Alteration of the CSH3 domain of Vav1 activates its transforming potential		82
RESULTATS COMPLEMENTAIRES		130
1	Activation de la kinase JNK au cours de la croissance des fibroblastes transformés	131
2	Implication de Rac dans la phosphorylation de la β -caténine et répartition intracellulaire de cette forme phosphorylée	133
3	Activation transcriptionnelle dépendante des facteurs TCF	134
DISCUSSION		137
1	Domaine CSH3 et capacité transformante	138
2	Implication de l'activité GEF dans la transformation	139
3	Autres voies de signalisation impliquées dans la transformation	140
4	Analyse de la voie d'activation JNK, β -caténine et Vav1	142
5	La β -caténine est une nouvelle cible fonctionnelle de Vav1 au niveau des jonctions d'adhésion	144
6	Mise en évidence de l'implication de Vav1 dans la fonction transcriptionnelle de la β -caténine	145
7	Implication de la régulation de la β -caténine par Vav1 dans le cancer	147
CONCLUSIONS		149
BIBLIOGRAPHIE		153

Table des Illustrations

Figure 1 : La superfamille Ras.....	13
Figure 2 : La famille des GTPases Rho.....	13
Figure 3 : Structure tertiaire du domaine G.....	14
Figure 4 : Représentation du site de reconnaissance des nucléotides (exemple de Ras).....	14
Figure 5 : Régulation des GTPases de la famille Rho.....	15
Figure 6 : Effecteurs des GTPases Rho impliqués dans le remaniement du cytosquelette.....	16
Figure 7 : La réorganisation du cytosquelette lors de la migration cellulaire.....	17
Figure 8 : Implication des GTPases Rho dans les cancers.....	18
Figure 9 : La jonction d'adhérence.....	19
Figure 10 : Voies des MAPK Jnk/p38.....	23
Figure 11 : La Voie Wnt/ β -caténine.....	25
Figure 12 : Structure des protéines de la famille Vav.....	27
Figure 13 : Structure détaillée de Vav1.....	28
Figure 14 : Principales fonctions de Vav.....	29
Figure 15 : Premier modèle de la structure de Rac1 complexé avec les domaines DH-PH-CRD de Vav1.....	31
Figure 16 : Deuxième modèle de la structure de Rac1 complexé avec les domaines DH-PH-CRD de Vav1.....	31
Figure 17 : Protéines partenaires de Vav1.....	32
Figure 18 : Modèle de conformation de Vav1.....	36
Figure 19 : Modèle de la conformation fermée de Vav.....	36
Figure 20 : La synapse immunologique.....	38
Figure 21 : Réorganisation du cytosquelette médiée par Vav1.....	39
Figure 22 : Activation des MAPK par Vav1 dans les lymphocytes T.....	41
Figure 23 : Activation des facteurs de transcription par Vav1.....	42
Figure 24 : Défaut de développement des lymphocytes T invalidés pour Vav1.....	44
Figure 25 : Défaut de développement des lymphocytes B invalidés pour Vav1.....	44
Figure 26 : Mode d'activation du potentiel transformant des protéines Vav.....	49
Figure 27 : Contribution des différents domaines au pouvoir transformant de Vav1.....	51
Figure 28 : Distribution des mutations de Vav1.....	58
Figure 29 : Localisation des mutations du gène Vav1.....	59

Figure 30 : Cinétique d'activation des kinases JNK1 et JNK2 dans les fibroblastes NIH3T3.....	114
Figure 31 : Courbe de prolifération des fibroblastes NIH3T3.....	114
Figure 32 : Analyse de la phosphorylation de la β -caténine.....	115
Figure 33 : Analyse de la répartition subcellulaire de la p- β -caténine.....	115
Figure 34 : Activation transcriptionnelle des promoteurs dépendant de TCF/LEF dans les cellules exprimant les protéines Vav1.....	116
Figure 35 : Modulation par Vav1 de l'expression de l'Axine2, cible spécifique de la β -caténine...	116
Figure 36 : Rôles des résidus Tyrosine de la β -caténine.....	122
Figure 37 : Modèle de régulation des fonctions de la β -caténine par les formes de Vav1 et implication dans la transformation cellulaire.....	130

Liste des Abréviations

ABD	Actin Binding Domain
Abl	Abelson tyrosine kinase
Ac	Acidic domain
AP1	Activating Protein-1
APC	Adenomatous Polyposis Coli
APL	Acute Promyelocytic Leukemia
AR	Androgen Receptor
Arp2/3	Actin-Related Proteins 2/3
ASK1	MAPK3 Apoptosis Signal-Regulating Kinase 1
ATF2	Activating Transcription Factor 2
ATRA	All-Trans Retinoic Acid
Axin2	Axis Inhibition Protein 2
BCR	B-Cell Receptor
Cbl	Casitas B-lineage Lymphoma
CDK	Cyclin Dependant Kinase
CH	Calponin homology domain
CK1	Casein kinase 1
CPA	Cellule Présentatrice d'Antigène
CR	Conserved Regions
CRD	Cystein Rich Domain
CSH	Cellule Souche Hématopoïétique
CXCL12	C-X-C motif chemokine 12 (ou SDF1 Stromal Cell-Derived Factor 1)
CXCR4	C-X-C Chemokine Receptor Type 4
DAG	Diacylglycerol
DBC	Ductal Breast Cancer
DH	Dbl Homology Domain
DKK1	Dickkopf-related protein 1
DNA-PK	DNA-dependant Protein Kinase
Ect2	Epithelial Cell-Transforming sequence 2 oncogene
EGFR	Epithelial Growth Factor Receptor
ERK	Extracellular signal Regulated Kinase
ERM	Ezrin/Radixin/Myosin

ER α	Eostrogen Receptor alpha
GADS	Grb2-related Adaptor Downstream of Shc
GAP	GTPase Activating Protein
GDI	Guanine nucleotide dissociation inhibitors
GDP	Guanosine Diphosphate
GEF	Guanosine Exchange Factor
Grb2	Growth factor Receptor-Bound protein 2
GSK3 β	Glycogen Synthase Kinase 3 beta
GST	GlutathioneS-Transferases
GTP	Guanosine Triphosphate
hnRNPK /hnRNPC	Heterogeneous RiboNucleoProtein K/C
HNSCC	Head and Neck Squamous Cell Carcinoma
hSiah-2	human homologues of Seven In Absentia 2
ICAM-1	Intercellular Adhesion Molecule 1
IFN	Interferon
IKK	I κ B Kinase
IL	Interleukin
IP3	inositol 1, 4, 5-trisphosphate
IQGAP	IQ motif containing GTPase Activating Protein
ITAM	Immunoreceptor Tyrosine based Activation Motif
Itk	Interleukin-2-inducible T-cell kinase
I κ B	Inhibitor of kappa B
Jak	Janus Kinase
JNK	c-Jun N-terminal Kinase
LAT	Linker of Activated T cell
Lck	Lymphocyte-specific protein tyrosine kinase
LEF	Lymphoid Enhancing Factor-1
LFA-1	Lymphocyte Function-associated Antigen 1
LRP5/6	Low-density lipoprotein receptor-related protein 5/6
Ly-GDI	Lymphoid-specific GDP dissociation inhibitor
MAP2K	MAP kinase kinase
MAP3K	Map kinase kinase kinase
MAPKs	Mitogen Activated Protein Kinase
MDCKII	Madin-Darby Canine Kidney II

MEF2	Myocyte Enhancer Factor-2
MEK	Mitogen-activated protein/Extracellular signal-regulated Kinase kinase
MK2	MAPK- activated kinase 2
MKK3/MKK4/MKK7	MAP Kinase Kinase 3/4/7
MLK3	Mixed Lineage Kinase 3
MSK1	Mitogen and Stress activated protein Kinase 1
MT1-MMP	Membran type I matrix metalloproteinase
Nck	Non Catalytic region of tyrosine Kinase adaptor protein 1
NFAT	Nuclear factor of activated T-cells
NfκB	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
NK	Natural Killer
NLS	Nuclear Localization Sequence
NSCLC	Non Small Cell Lung Carcinoma
OSCC	Oral Squamous Cell Carcinoma
Pak1	p21-activating kinase 1
PDGFR	Platelet Derived Growth Factor
PH	Pleckstrin homology domain
PI3K	Phosphatidyl-inositol-3 phosphate- kinase
PIP2	Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate
PIP5K	phosphatidyl-inositol-4 phosphate- 5 kinase
PKC	Protein Kinase C
PLCγ	Phospholipase C gamma
PMA	Phorbol Myristate Acetate
PRLr	Prolactin receptor
RasGRF2	Ras-specific Guanine nucleotide-Releasing Factor 2
RasGRP1	RAS guanyl releasing protein 1
RING-finger	Really Interesting New Gene- finger
SAM68	Src-Associated protein in Mitosis of 68KDa
SCF	Stem Cell Factor
SH2	Src -homology domain 2
SH3	Src-homology domain 3
SHP-1	SH2-containing tyrosine Phosphatase 1
SKAP55	Src Kinase–Associated Phosphoprotein of 55 kDa
SLP76	SH2 domain-containing Leukocyte Protein of 76 kDa

SMAC	Supramolecular Activation Cluster
Socs1	Suppressor Of Cytokine Signaling 1
Sos	Son of sevenless
STAT3	Signal Transducer And Activator Of Transcription 3
Syk	Spleen tyrosine kinase
TCF	T-Cell Factor
TCR	T-Cell Receptor
TGF β	Transforming Growth Factor Beta
Tiam1	T-cell lymphoma invasion and metastasis 1
TNF	Tumor Necrosis Factor
v-Crk	Avian Sarcoma Virus CT10 Oncogene Homolog
WASP	Wiskott-Aldrich syndrome protein
ZAP70	Zeta-chain-associated protein kinase 70
β -TrcP-E3	Beta-transducin repeats-containing proteins E3-ligase

Introduction

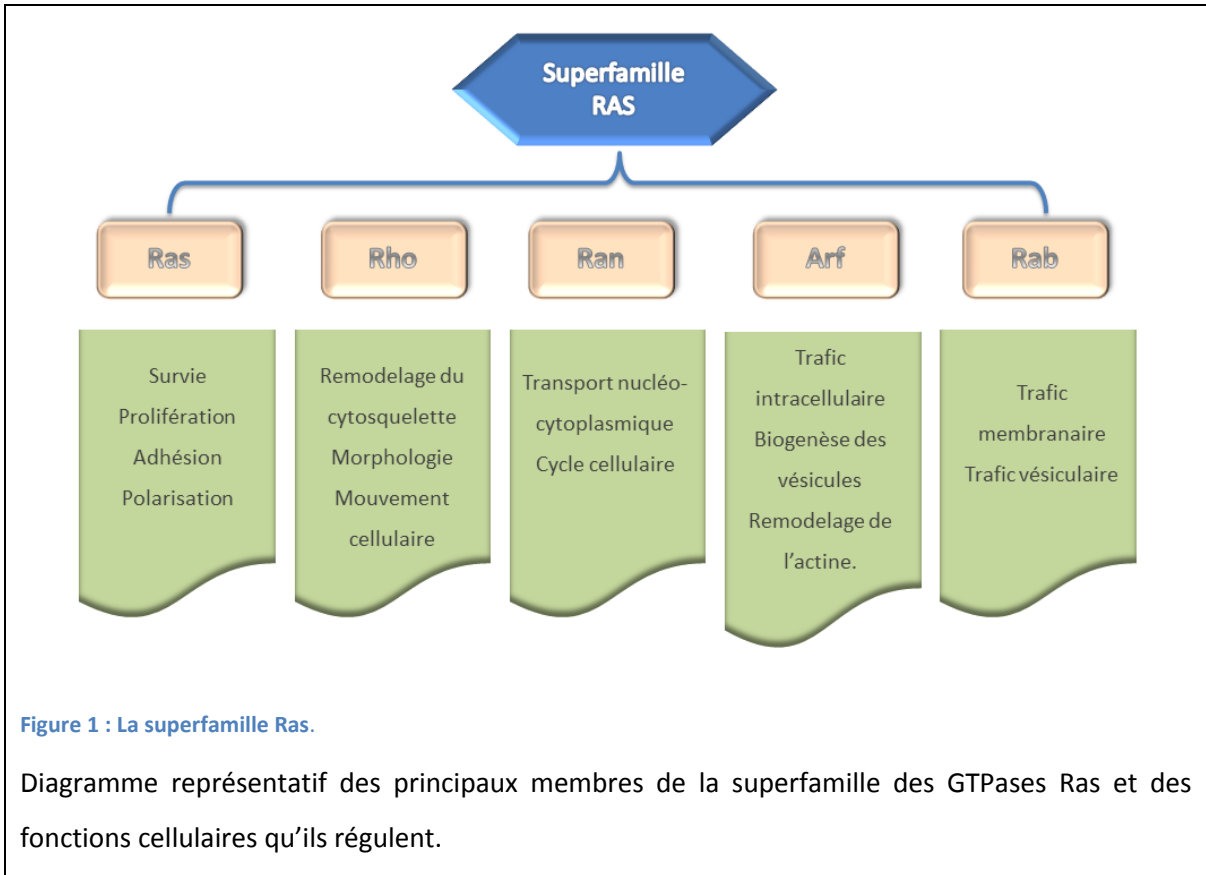
L'homéostasie cellulaire requiert une connexion permanente de la cellule avec son environnement, nécessitant ainsi une communication intercellulaire mais aussi intracellulaire. Cette communication est initiée par la liaison d'un ligand à son récepteur spécifique, le plus souvent localisé à la membrane. L'interaction ligand- récepteur déclenche une cascade de signalisations aboutissant à des réponses cellulaires telles que : la survie, la croissance, la prolifération et la migration. La capacité des cellules à migrer, à interagir avec les cellules voisines ou à adhérer à une matrice extracellulaire est un facteur indispensable au maintien de l'intégrité des tissus ainsi qu'à leur remodelage lors de blessures. Dans les pathologies cancéreuses, les cellules transformées vont mettre à profit leurs nouvelles capacités migratoires et propriétés adhésives pour activer des processus tumorigènes et métastatiques. Les mécanismes moléculaires qui gouvernent la motilité et l'adhésion cellulaire sont intimement liés à la réorganisation du cytosquelette, une fonction contrôlée par les protéines de liaison au GTP (GTPases). Les GTPases sont des intermédiaires clé de la signalisation intracellulaire qui vont être activées par de nombreux récepteurs différents et vont relayer les messages indispensables aux processus aussi bien physiologiques que pathologiques de la cellule.

PARTIE I : LES PROTAGONISTES DE LA TRANSFORMATION CELLULAIRE

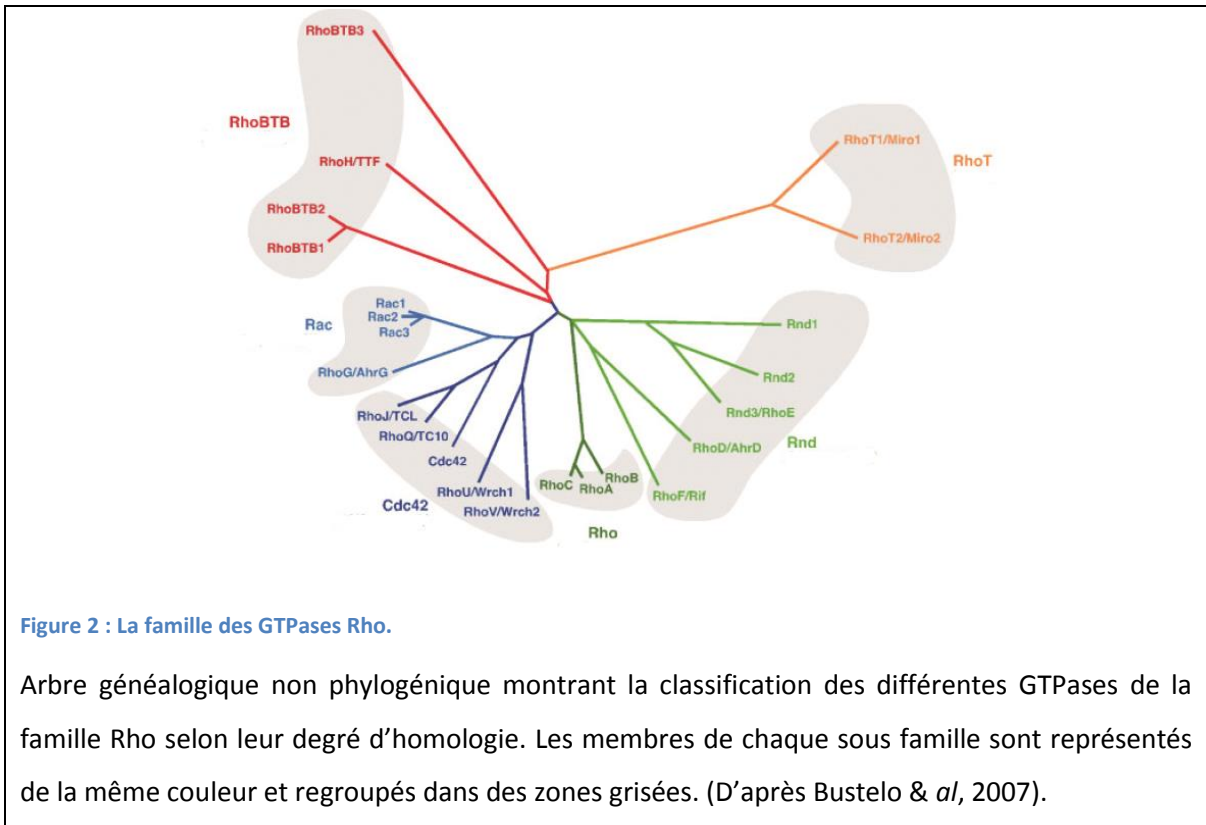
1 La signalisation dépendante des GTPases et le remaniement du cytosquelette

1.1 Les principales familles de GTPases

Les petites GTPases sont des protéines G monomériques qui peuvent lier le GTP ou le GDP selon leur état d'activation. Les GTPases, *via* l'hydrolyse du GTP servent d'échangeurs dans la signalisation intracellulaire. Elles sont localisées au contact de différents compartiments cellulaires : la membrane plasmique ou les vésicules, le cytoplasme et le noyau. Le génome humain code plus d'une centaine de protéines G regroupées dans ce qui est communément appelé « la superfamille des protéines Ras » qui comprend cinq familles : Ras, Rho, Rab, Ran, Arf, **Figure 1**. Les deux premières familles Ras et Rho sont les plus connues et les mieux caractérisées chez l'Homme ; l'une pour notamment ses propriétés oncogéniques et l'autre pour son rôle majeur dans le remodelage du cytosquelette d'actine, ainsi que les différentes fonctions cellulaires qui y sont associées (1, 2). Chez l'espèce humaine, il existe 3 gènes Ras conduisant à 3 isoformes : H-Ras, K-Ras et N-Ras.



La famille des Rho GTPases comporte environ une trentaine de membres et elle est subdivisée en six sous familles : Rho, Rac, Cdc42, Rnd, RhoBTB et RhoT, **Figure 2**.



Les protéines de la famille Rab et de la famille Arf sont impliquées majoritairement dans les trafics vésiculaires ainsi que dans les trafics intracellulaires des protéines entre les différentes organelles. Enfin les protéines Ran sont décrites pour être les plus abondantes dans la cellule et sont impliquées principalement dans les transports nucléaires et le cycle cellulaire (3, 4).

1.2 Base structurale des GTPases

Les petites protéines G sont constituées d'une seule chaîne polypeptidique avec un poids moléculaire allant de 20kDa à 40kDa selon les familles. Dans leur structure tertiaire, les petites protéines G sont constamment associées au magnésium qui leur permet de lier efficacement le GDP/GTP. Les données cristallographiques obtenues sur différents membres de la famille tels Ras, Rho, Rac1, Cdc42 ou Arf, ont mis en évidence la présence d'un domaine catalytique de 20kDa, appelé « domaine G » qui est commun à toute la superfamille. Ce domaine est organisé en cinq hélices alpha et six feuillets beta connectés par des boucles polypeptidiques pouvant lier le phosphate (boucle G1) et le magnésium (boucles G2, G3), **Figure 3**.

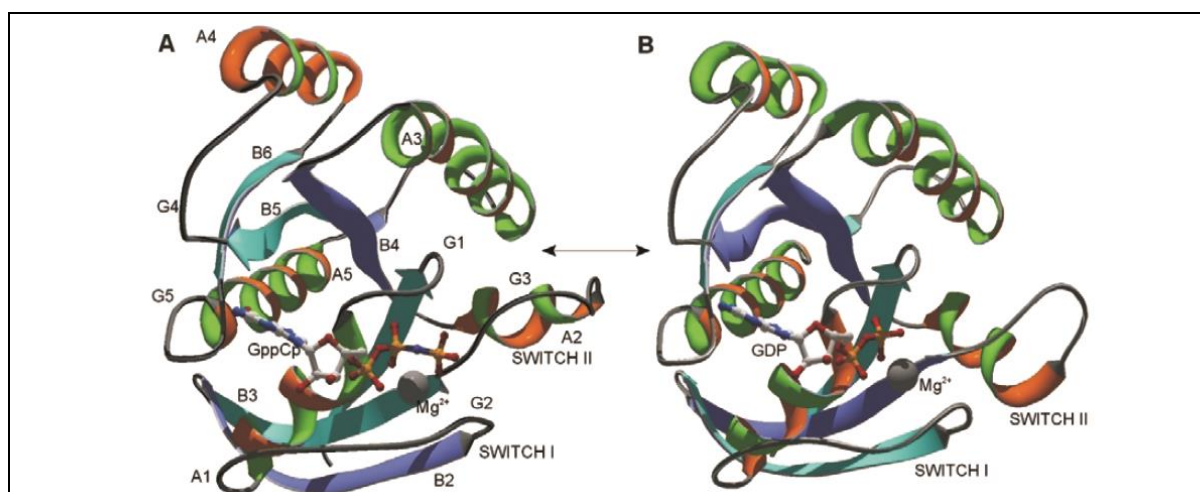
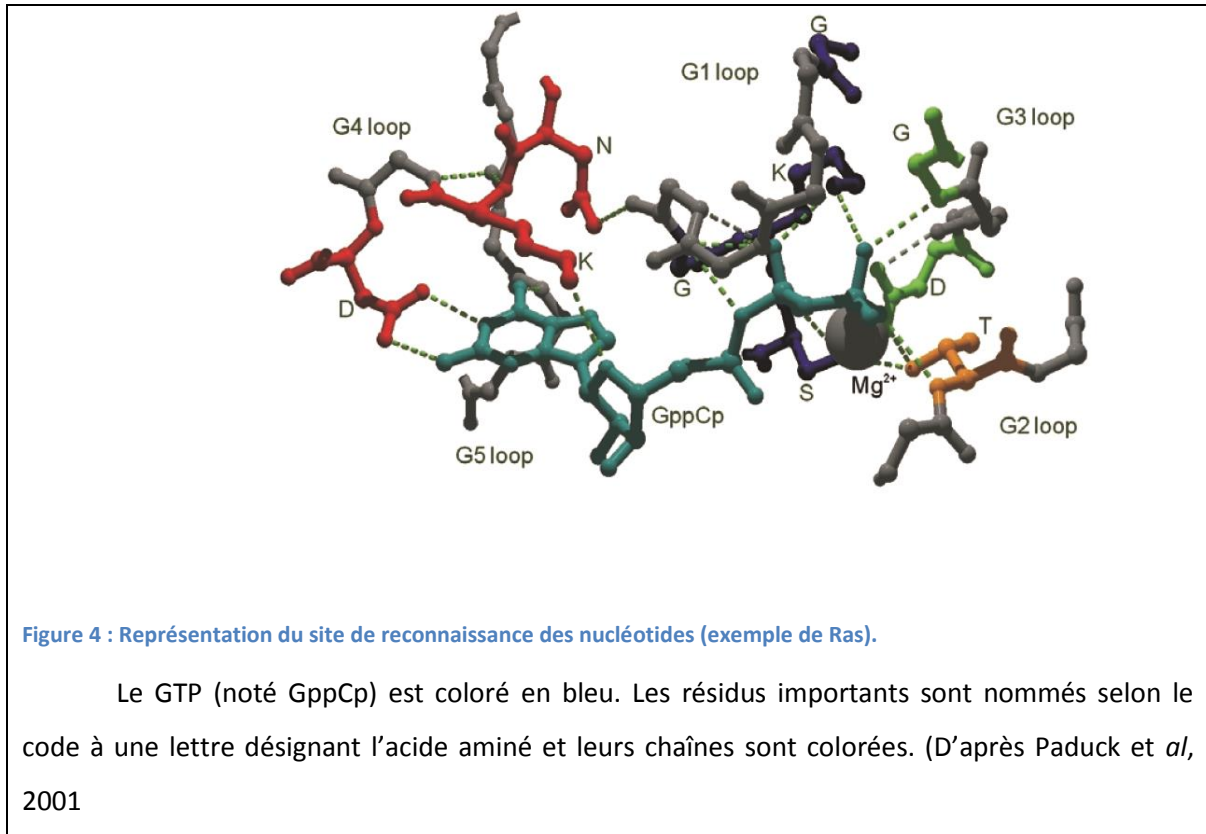


Figure 3 : Structure tertiaire du domaine G.

La figure représente le domaine G de Ras et le changement de structure des régions *switch I* et *II* lors de la liaison des nucléotides. La structure générale comprend 5 hélices alpha marquées A1-A5, 6 feuillets beta notés B1-B6 et 5 boucles notées G1-G5. A) Complexe Ras, GTP (noté GppCp) et ion Mg^{2+} . B) Complexe Ras, GDP et ion Mg^{2+} . (D'après Paduck et *al*, 2001).

Le site de reconnaissance de la guanine est constitué par les boucles G4 et G5. Plus précisément une séquence consensus NKXD, contenant une lysine et un acide aspartique, est impliquée dans la liaison directe avec le nucléotide, **Figure 4**. L'étude des protéines G liées avec le GDP ou avec le GTP a amené la distinction de deux régions fonctionnelles importantes dénommées *switch I* et *switch II* entourant le groupe phosphate du nucléotide (5).



Des études structurales comparatives ont mis en évidence que les boucles G1 et G4 décrites précédemment sont conservées parmi toutes les familles de GTPases, à la différence des régions G2 et G3 qui sont plus diversifiées. De ce fait, les différences conformationnelles de ces régions affectent de manière directe la capacité des protéines G à interagir avec divers partenaires ainsi que la cinétique de la réaction d'échange.

1.3 Principe de la réaction d'échange et modification conformationnelle associée

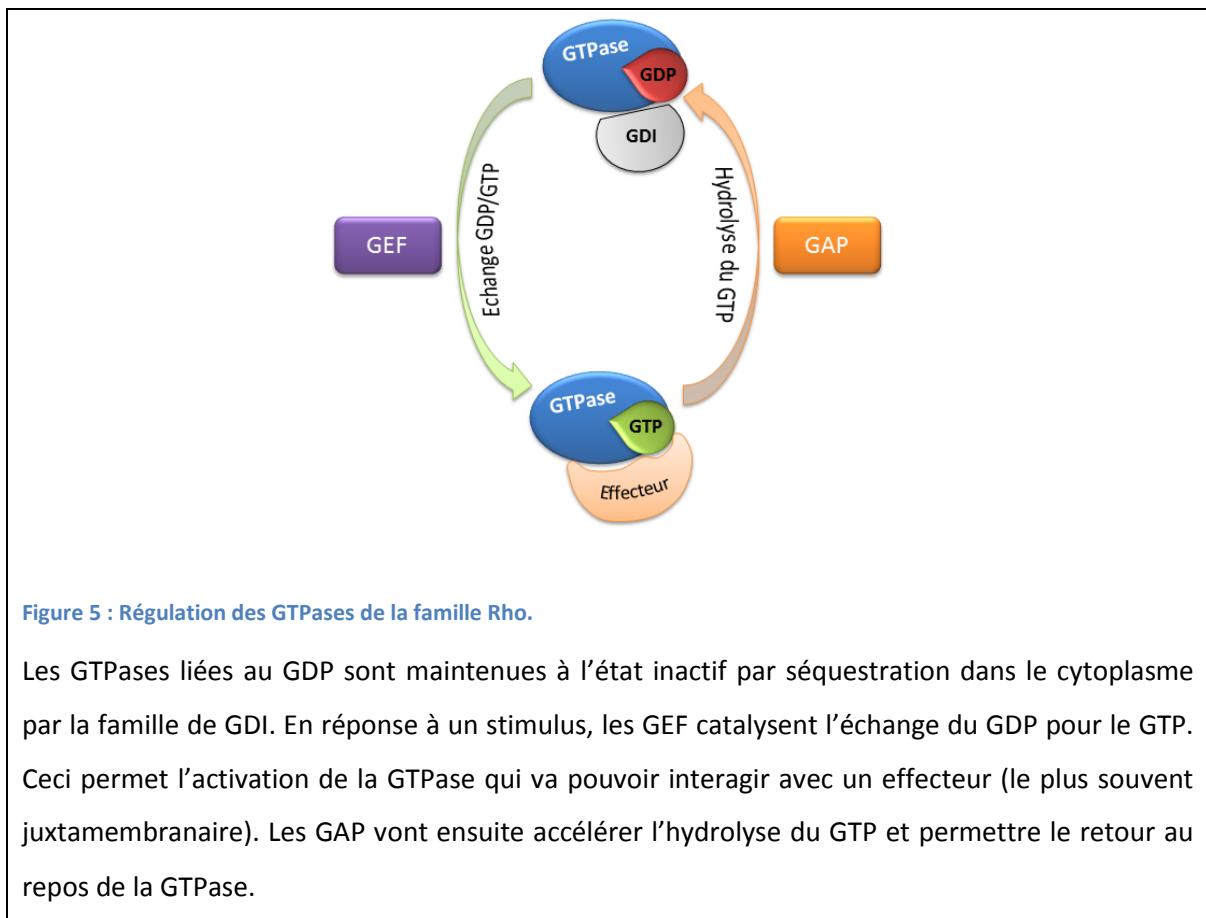
A l'état libre, non liées aux nucléotides, les petites protéines G sont très instables et sont rapidement dégradées. Elles s'associent donc alternativement soit au GDP qui définit un état inactif, soit au GTP qui correspond à un état actif. L'échange du GDP pour le GTP, et donc l'activation de la protéine, est accompagné d'un changement de conformation, notamment dans les régions *switch I* et *II*, qui permet de dégager un site de reconnaissance pour un effecteur. Alors que Ras est ancré à la membrane de manière permanente, les GTPases de la famille Rho actives se lient aux lipides membranaires, ce qui leur permet d'interagir avec leurs effecteurs. Les

déterminants structuraux présents dans le domaine G qui modulent l'affinité pour les nucléotides sont localisés non seulement dans les boucles G1, G2 et G3, mais également sur des portions externes à ces boucles. Par exemple, les interactions moléculaires entre les feuillets B1/B2 et l'hélice A5 sont responsables de l'affinité pour le GDP. L'interaction entre le phosphate et le magnésium assure la rigidité des régions *switch I/II* tandis que l'hydrolyse du GTP déstabilise cette région effectrice (2, 5), **Figure 3**.

La structure du domaine de liaison aux nucléotides et ses caractéristiques sont conservées parmi les différentes familles de GTPases (Ras, Rho, Arf, Rab, Ran). Ainsi, toutes les petites protéines G lient fortement le GDP et ont une faible capacité à hydrolyser le GTP. Afin de contrôler leur cycle d'activation, elles ont donc besoin de protéines régulatrices qui vont faciliter la dissociation du GDP et accélérer l'hydrolyse du GTP.

1.4 Régulateurs des GTPases.

Il existe deux types principaux de protéines régulatrices contrôlant l'activation des GTPases : les facteurs d'échange du GDP/GTP (GEF : Guanosine Exchange Factor) et les protéines activatrices des GTPases (GAP : GTPase Activating Proteins), **Figure 5**.



Le GEF catalyse l'échange d'une molécule de GDP pour une molécule de GTP en réponse à une stimulation permettant ainsi l'activation de la petite protéine G. En interagissant au niveau des régions *switch*, le GEF déstabilise la liaison du nucléotide et permet la libération du GDP contre la fixation du GTP. Le module responsable de cette interaction, appelé domaine d'homologie à Dbl (DH), est souvent associé à un domaine homologue à la Pleckstrine (PH) au sein d'une structure multi modulaire. Certains GEF sont spécifiques d'une seule GTPase alors que d'autres peuvent agir sur plusieurs, à l'exemple de Dbl (le premier GEF d'identifié) qui peut activer à la fois Rho et Cdc42 (3, 6, 7).

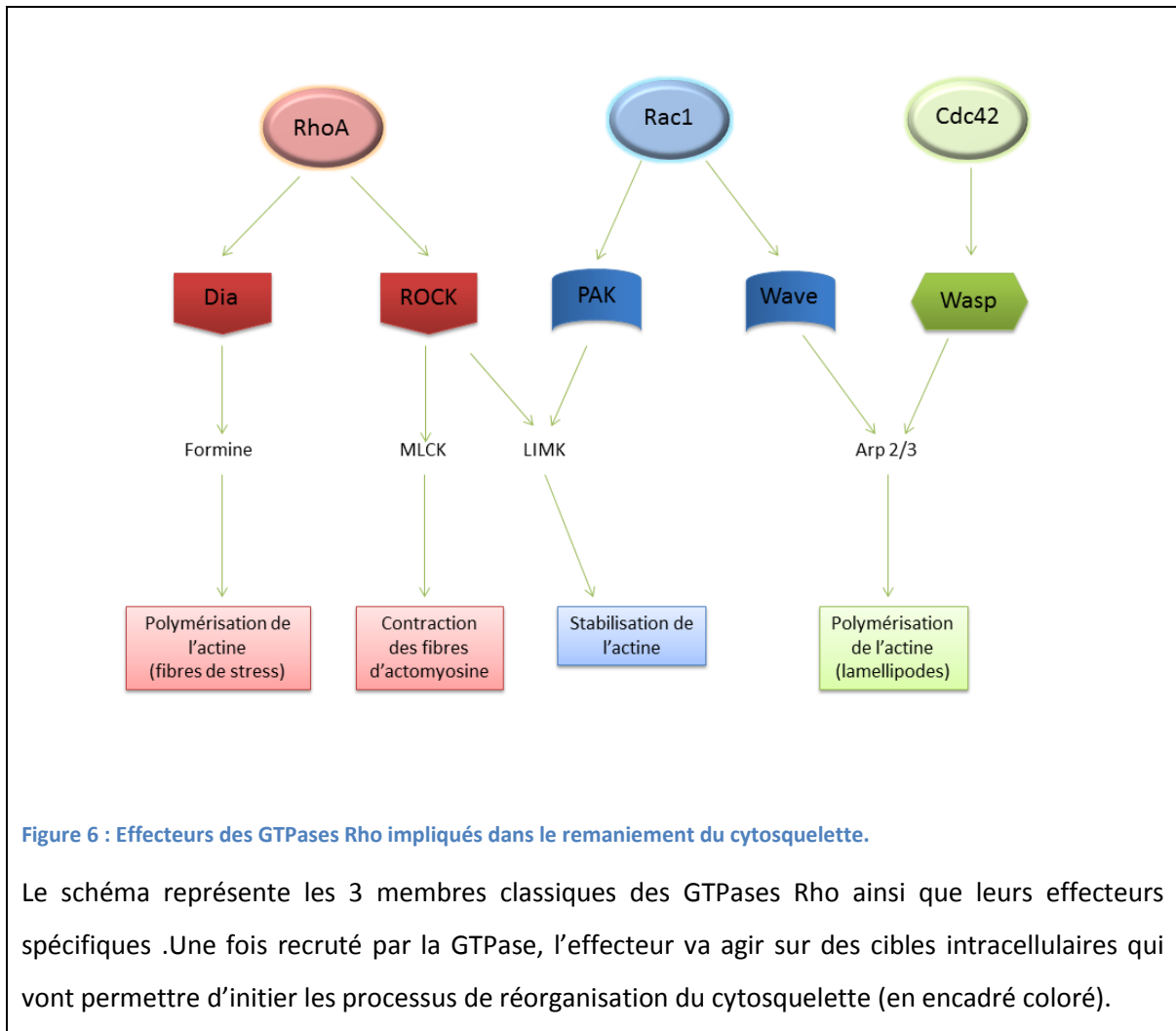
Le GAP accélère l'hydrolyse du GTP permettant le retour à l'état de repos de la GTPase à la fin du cycle de stimulation. Les GAP sont des protéines multi modulaires avec une structure en hélice contenant des régions flexibles aptes à changer de conformation lors de la fixation du GTP. La stratégie d'activation générale est une stabilisation des régions *switch* lors de l'interaction de la protéine régulatrice avec le domaine G de la GTPase. L'activité d'une GAP n'est pas restreinte à une seule GTPase toutefois elle est propre à une famille spécifique (3, 6, 7).

Une troisième catégorie de régulateurs, cette fois spécifique des GTPases de la famille Rho et Rab, existe : les GDI (Guanine nucleotide Dissociation Inhibitors). Les GDI lient les GTPases et les protègent de l'action des GEF. En plus de leur rôle inhibiteur sur la dissociation du nucléotide, elles peuvent extraire la GTPase de la membrane pour la séquestrer au niveau du cytoplasme. En se fixant aux régions *switch*, les GDI maintiennent les GTPases dans un état inactif en absence de stimulation (3, 6, 7).

Ces principes généraux sur la régulation des GTPases les placent au cœur de plusieurs voies de signalisation. Un nombre élevé de récepteurs et de GEF peut les activer ; de même une variété de cibles ou d'effecteurs interagit avec elles. Elles ont donc une implication fonctionnelle dans de multiples activations cellulaires.

1.5 Fonctions physiologiques des GTPases : cas de la famille Rho

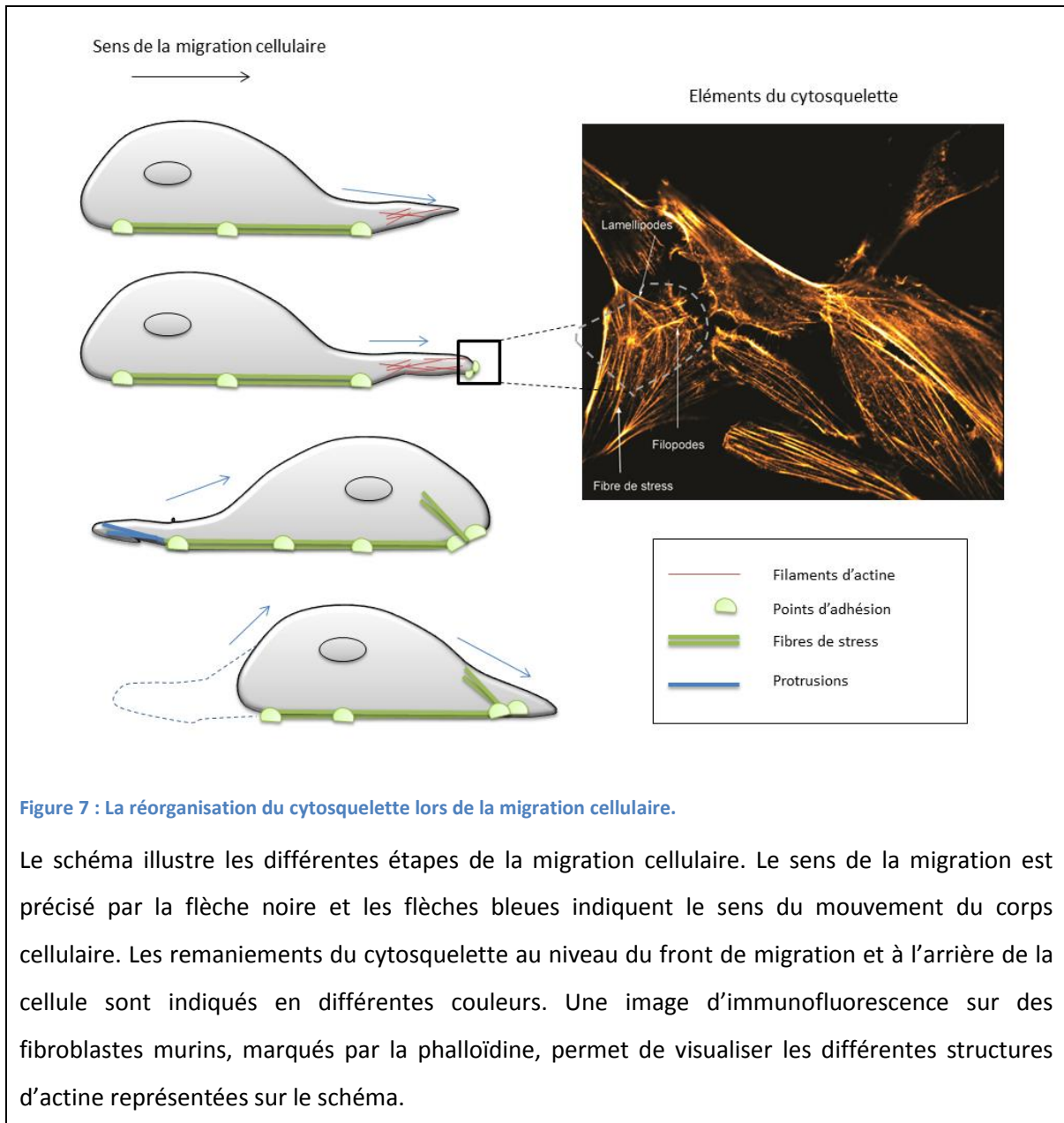
Dans le contexte de ce travail, un accent particulier sera mis sur la famille des Rho GTPases et leur rôle primordial dans la réorganisation du cytosquelette, **Figure 6**. Elles participent ainsi à un processus vital pour la cellule, notamment lors de l'embryogenèse ou au cours de la réparation tissulaire ou la défense immunitaire. Par ailleurs lorsque la cellule est dérégulée, la réorganisation du cytosquelette fait adopter à la cellule, une morphologie et un phénotype particuliers conduisant à la transformation.



1.5.1 Réorganisation du cytosquelette

Le cytosquelette cellulaire est structuré par des filaments d'actine et des protéines spécialisées qui lui sont associées. Les remaniements du cytosquelette liés à la famille Rho ont été mis en évidence en premier lieu dans les fibroblastes puis différents types cellulaires : cellules neuronales, épithéliales, hématopoïétiques (1). Il a été démontré que l'activation de Rho conduit à la formation de fibres de stress ; ces faisceaux de filaments d'actine traversent toute la cellule. L'activation de Rac, elle, résulte en la formation de lamellipodes qui sont des feuillets juxtamembranaires très fins, retrouvés le plus souvent sur des cellules en migration. Le repli de ces lamellipodes lors du détachement d'un substratum forme les protrusions. L'activation de Cdc42 permet la formation de filopodes : ils sont également constitués de faisceaux de longs filaments d'actine en forme de doigt et dirigés vers les protrusions (8). L'organisation des filaments d'actine selon ces différentes structures contribue à la capacité de la cellule à se mouvoir et à adhérer à la matrice extracellulaire. Les lamellipodes, localisés généralement au

niveau du front de migration de la cellule, fournissent la force nécessaire à la cellule pour bouger. L'activation de Rho permet de moduler les contractions des filaments d'actine et de myosine ; les filopodes eux, contrôlent la polarité de la cellule et dirigent la migration (9) **Figure 7**.



1.5.2 Autres activations cellulaires

L'activation des GTPases en réponse à la stimulation de récepteurs de surface (récepteurs aux facteurs de croissance, récepteurs à activité tyrosine kinase, récepteurs immuns...) peut intervenir, selon les effecteurs engagés, dans plusieurs autres fonctions cellulaires. Par exemple, les GTPases de la famille Rho ont été décrites pour être impliquées dans la progression du cycle

cellulaire. Dans les cellules eucaryotes, le cycle cellulaire comporte deux phases : une phase de réplication (phase S) et une phase de division nucléaire et cellulaire (la mitose ou phase M). Ces phases sont séparées par deux phases de saut ou « gap » G1 et G2. Il a été montré que les GTPases Rho régulent l'organisation du cytosquelette d'actine et des microtubules lors de la mitose. Elles modulent aussi l'activité des kinases spécifiques, les *cyclin dependant kinase* (Cdk), qui permettent la progression des cellules dans la phase G1 (10, 11).

Aussi bien Rho, Rac que Cdc42 peuvent activer les voies des MAP kinases JNK et p38. Les kinases JNK et p38 sont activées par divers mitogènes tels que les facteurs de croissance, les cytokines inflammatoires et le stress environnemental. Elles convertissent le stimulus extracellulaire en un signal intra cytoplasmique aboutissant à l'activation de facteurs de transcription qui vont transcrire des gènes cibles. Rac, en particulier, peut stimuler l'expression du gène de la cycline D1 (une protéine du cycle cellulaire) par le biais du facteur de transcription NfκB (12). Nous aurons l'occasion de revoir les voies de signalisations des kinases JNK et p38 dans les paragraphes suivants.

Les GTPases Rho peuvent aussi influencer l'activité de certaines enzymes spécifiques dans la cellule. Rac régulent la formation de « radicaux superoxydes » dans les cellules phagocytaires en ciblant la p67phox, un composant du complexe NADPH oxidase de la chaîne respiratoire. Les GTPases Rho modulent l'activité de certaines enzymes impliquées dans le métabolisme des phospholipides telles que la phosphatidyl-inositol-4 phosphate- 5 kinase (PIP5K), la phosphatidyl-inositol-3 phosphate- kinase (PI3K), les phospholipases C ou D. Au chapitre 2, nous reverrons les voies de signalisation de ces kinases à travers des exemples.

1.6 Activation des Rho GTPases dans les pathologies

Jusqu'à présent, excepté pour la famille Ras, l'apparition de dysfonctionnements pathologiques liés aux GTPases, tels certains cancers, découle le plus souvent d'une dérégulation de leur activité plutôt que d'une mutation, **Figure 8**. Afin d'étudier les fonctions des GTPases *in-vitro*, les chercheurs ont souvent recours à des formes constitutivement actives ou des formes « dominant -négatif » des GTPases. Ces formes modifiées des GTPases portent une mutation dans leur domaine de liaison du GTP qui leur permet soit de lier constitutivement le GTP (formes actives), soit d'empêcher l'échange du GDP (dominants – négatifs). Introduites dans les cellules, ces GTPases modifiées vont entrer en compétition avec les GTPases endogènes et interférer avec les signalisations qui leur sont dépendantes.

GTPase	Mécanisme de dérégulation	Type de Tumeur
RhoA	Elévation de l'expression /Augmentation de la signalisation	Hépatique, peau, côlon, ovarien, rate, vessie, gastrique, testiculaire, mammaire...
Rho C	Elévation de l'expression /Augmentation de la signalisation	Métastases de mélanome, mammaire, pancréas, cou et tête, hépatique, ovarien, prostate, gastrique, pulmonaire...
Rho H	Réarrangement et mutations	Lymphomes non Hodgkinien et myelomes
Rac1	Elévation de l'expression /Augmentation de la signalisation	Testiculaire, gastrique, mammaire...
Rac2	Elévation de l'expression	Carcinome squameux de la tête et du cou
Rac3	Hyper activation ou surexpression	Mammaire

Figure 8 : Implication des GTPases Rho dans les cancers.

Tableau montrant quelques exemples de mécanismes de dérégulation de l'expression ou de l'activité des GTPases de la famille Rho décrits dans la littérature pour être associés au cancer (adapté de Parri & *al*, 2010).

La forme constitutivement active de la GTPase Rac (RacV12) permet la croissance en absence de support et stimule la prolifération des fibroblastes ; ces effets sont abolis par l'expression du dominant-négatif de cette GTPase (RacN17) (13). De nombreux autres travaux ont mis en évidence que les GTPases Rho pouvaient affecter les propriétés tumorigéniques des cellules cancéreuses de par leur action sur le cytosquelette. Ainsi, la déplétion de Rac1 par l'utilisation d'ARN interférent abolit la migration et l'invasion de cellules de glioblastomes et de cancer du sein. Dans le cancer du sein, l'inhibition de la signalisation dépendante de l'isoforme RhoA abolit aussi les propriétés métastatiques de son partenaire, le CD44 qui est le récepteur de l'acide hyaluronique (14). Il n'est pas rare non plus de détecter dans certains cancers une surexpression des GTPases de la famille Rho. Rac1 par exemple, a été retrouvée surexprimée dans des cellules tumorales issues de cancers du sein, du poumon ou de la prostate. L'isoforme RhoA est également surexprimée dans des cancers du côlon ou des cancers gastriques, ainsi que dans ceux décrits précédemment pour Rac1 (15, 16).

A travers l'exemple des GTPases de la famille Rho, il est clair que la cellule normale requiert l'activité de ces protéines pour assurer sa survie, sa prolifération et sa migration. Lors de la transformation et la tumorigénèse, la cellule cancéreuse met à profit ces fonctions des GTPases pour assurer sa propre survie, la croissance et la transformation métastatique de la tumeur. Cependant, le processus métastatique nécessite également une modulation des jonctions cellulaires qui va permettre la prolifération et la progression de la cellule tumorale.

2 Les jonctions d'adhérence et l'inhibition de contact

Il existe 2 types de jonctions qui lient les cellules entre elles : les jonctions serrées et les jonctions d'adhérence, ces dernières étant les plus ubiquitaires. Les jonctions serrées servent de barrière contrôlant les flux d'eau, d'ions et d'autres molécules solubles entre les cellules. Les jonctions d'adhérence, elles, ont pour rôle principale le maintien de l'architecture des tissus ainsi que la limitation des mouvements et de la prolifération des cellules lorsqu'elles arrivent à confluence : c'est le mécanisme d'inhibition de contact. Les jonctions d'adhérence sont constituées de 2 grandes familles de protéines : les cadhérines et les caténines **Figure 9**.

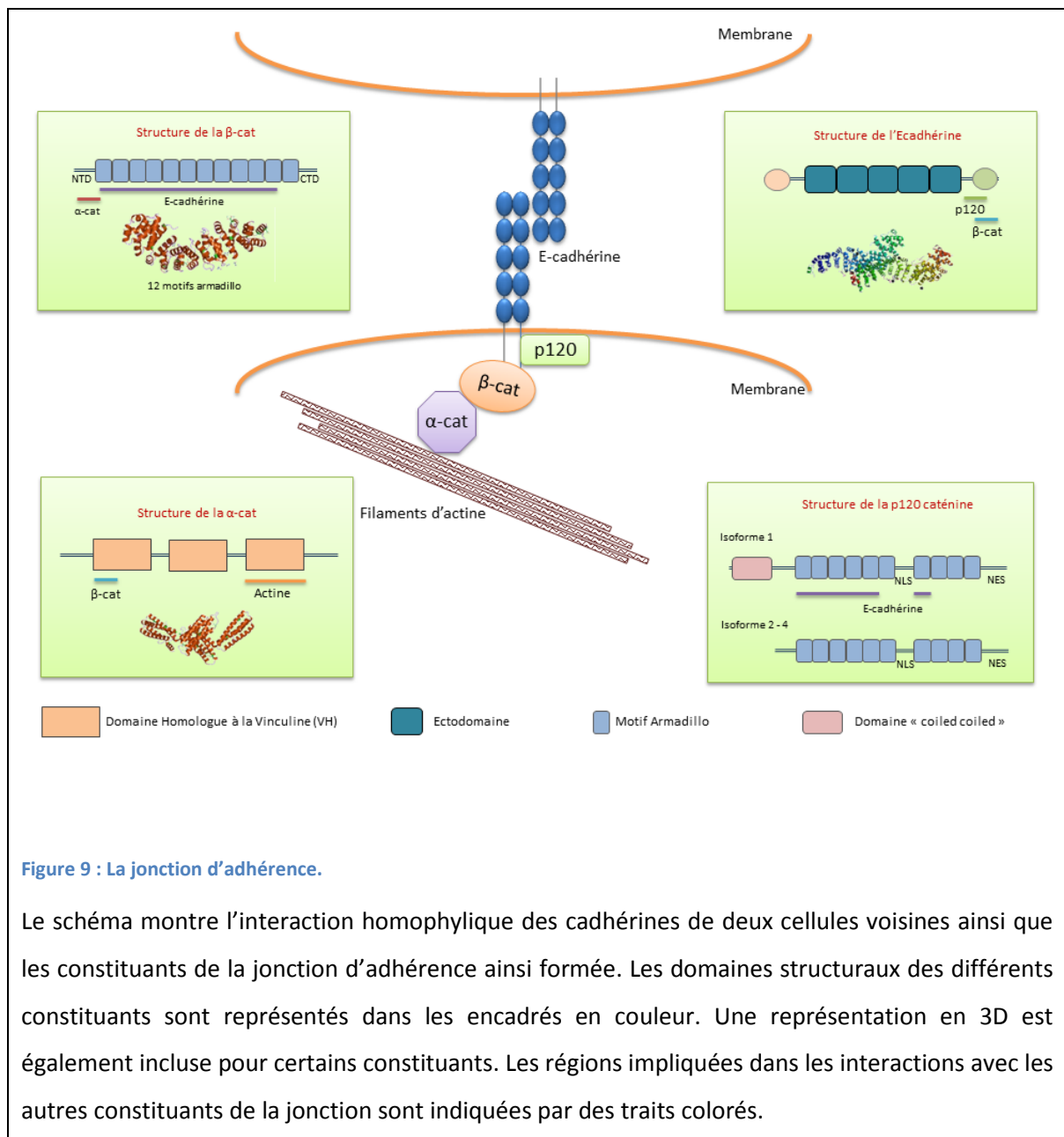


Figure 9 : La jonction d'adhérence.

Le schéma montre l'interaction homophile des cadhérines de deux cellules voisines ainsi que les constituants de la jonction d'adhérence ainsi formée. Les domaines structuraux des différents constituants sont représentés dans les encadrés en couleur. Une représentation en 3D est également incluse pour certains constituants. Les régions impliquées dans les interactions avec les autres constituants de la jonction sont indiquées par des traits colorés.

2.1 Les cadhérines

Ce sont des glycoprotéines transmembranaires qui permettent l'association entre elles de cellules exprimant la même famille de cadhérine (interaction homophile). La famille comporte plusieurs membres en fonction des types cellulaires dans lesquels ils s'expriment : N-cadhérine (cellules neuronales), E-cadhérines (cellules épithéliales), VE-cadhérine (cellules endothéliales), P-cadhérine (cellules placentaires), R-cadhérine (cellules rétinienne), M-cadhérine (cellules musculaires). Leur structure générale comprend entre autre un domaine extracellulaire ou ectodomaine, constitué de 5 motifs répétés, un court domaine trans-membranaire et un domaine cytoplasmique **Figure 9**. L'interaction homophile entre cadhérines se fait *via* leurs domaines extracellulaires et cette interaction nécessite la présence d'ions Ca^{2+} . Les cadhérines sont connectées au milieu intracellulaire et stabilisées par l'association avec les protéines de la famille des caténines. Le domaine cytoplasmique est subdivisé en un domaine de liaison à la β -caténine et un domaine juxtamembranaire qui lie la p120-caténine. Lors de la formation de contacts cellulaires, les molécules de cadhérines vont s'agréger en *cluster* puis s'étendre latéralement afin de renforcer et rigidifier l'adhésion (17, 18).

2.2 Les caténines

Les caténines sont des protéines caractérisées par la présence de motifs structuraux particuliers : les domaines *armadillo*. Dans le complexe de jonction, il existe 3 principaux membres :

2.2.1 α -caténine

Elle comprend environ 900 acides aminés et relie le complexe cadhérine-caténine aux filaments d'actine. Il est à préciser que l' α -caténine interagit avec l'actine de manière constitutive. Au niveau de sa structure, c'est une protéine qui possède une forte homologie avec la vinculine (une protéine du cytosquelette) et elle est très différente au niveau de sa séquence des autres caténines. Elle est dépourvue de motifs *armadillo*, par contre elle contient 3 domaines d'homologie à la vinculine qui lui permettent d'interagir avec ses différents partenaires **Figure 9**. Il existe 3 isoformes décrites et exprimées dans les cellules épithéliales, neuronales, cardiaques et testiculaires. L' α -caténine peut se trouver à l'état monomérique ou dimérique et s'associer respectivement soit à la β -caténine soit à l'actine. Plusieurs études ont proposé un modèle dynamique où l' α -caténine peut permuter entre la jonction cellulaire et le cytosquelette. Ceci serait possible grâce à l'existence de différents pools de la protéine : un pool de monomères d' α -caténine localisés au niveau de la membrane plasmique et liés à la β -caténine et un pool cytoplasmique sous forme de dimères libres ou associés aux filaments d'actine (17, 18).

2.2.2 β -caténine

Une seule isoforme de la β -caténine est présente chez les vertébrés. Sa structure consiste en une séquence d'environ 781 acides aminés organisées en : une région amino-terminale (150 acides aminés), une région centrale avec une répétition de 12 motifs *armadillo* et une région carboxy-terminale (100 acides aminés), **Figure 9**. Elle est liée à la fois à la cadhérine au niveau de ses domaines *armadillo* et à l' α -caténine au niveau des résidus 118-149 précédant le début de ces domaines. La β -caténine cellulaire existe majoritairement sous une forme complexée avec la cadhérine pour laquelle elle possède une très forte affinité (17, 18). La β -caténine peut être libérée des jonctions cellulaires par phosphorylation par des kinases particulières. La β -caténine qui se retrouve ainsi dans le cytoplasme possède normalement une très courte durée de vie. En effet, elle est rapidement phosphorylée et pris en charge par un complexe de destruction (19). Cependant cette théorie est actuellement soumise à controverse car des travaux ont décrit la présence de pools minoritaires de β -caténine qui peuvent rester dans le cytoplasme sans être dégradés. En plus de son rôle à la jonction, la β -caténine participe aussi à la transduction de la voie Wnt dans laquelle elle détient un rôle de co-activateur transcriptionnel ; nous en reparlerons dans les prochains paragraphes.

2.2.3 p120-caténine

Ce 3^{ème} membre de la famille des protéines à domaine *armadillo* a été identifié dans un premier temps comme un substrat de la protéine tyrosine kinase Src. Il existe 4 isoformes de p120-caténine issus de modifications post transcriptionnelles. La première isoforme se distingue des 3 autres, par la présence d'un domaine « coiled-coiled » dans la région N-terminal. Ainsi, la p120-caténine compte donc un domaine amino-terminal de longueur variable selon les isoformes, un domaine *armadillo* avec 10 motifs répétés et un domaine carboxy-terminal, **Figure 9**. Elle est liée à la cadhérine *via* la région juxtamembranaire de cette dernière au niveau d'une séquence conservée YDEEGGGE (17, 18).

2.3 Rôle des différents composants au sein du complexe d'adhérence

Le rôle principal de la cadhérine est de maintenir l'intégrité des tissus grâce aux interactions adhésives qu'elle établit au niveau des jonctions intercellulaires. L'adhésion médiée par la cadhérine est très dynamique et elle permet la réorganisation ou la dispersion des cellules lors de processus physiologiques, comme par exemple la transition épithélio-mésenchymateuse au cours du développement. Dans le contexte de ce travail, nous nous référerons principalement à l'E-cadhérine exprimée dans les cellules épithéliales.

L' α -caténine fournit un lien mécanique stable entre le contact extracellulaire et le cytosquelette interne en médiant l'interaction du complexe β -caténine-cadhérine avec les filaments d'actine. Ainsi, c'est le principal régulateur de l'assemblage des filaments d'actine et de leur dynamique au niveau des jonctions cellulaires. Des études ont démontré que l' α -caténine permet la formation de lamellipodes entre les cellules en contact. Ces lamellipodes vont se transformer en une structure adhésive continue lors de la maturation des jonctions (17, 18).

L'interaction de la β -caténine avec l'E-cadhérine permet à celle-ci de sortir du reticulum-endoplasmique après sa synthèse. Les deux protéines sont alors acheminées ensemble vers la surface de la cellule. La β -caténine participe de ce fait aux mécanismes moléculaires qui régulent la disponibilité de la cadhérine à la surface cellulaire. L'interaction entre les deux protéines est régulée par la phosphorylation de résidus spécifiques (20).

Enfin, il a été mis en évidence que l'interaction de la p120-caténine avec l'E-cadhérine est nécessaire au renforcement de la capacité d'adhésion des cellules. La p120-caténine stabilise l'E-cadhérine et permet la rétention du complexe à la membrane plasmique. En effet, la p120-caténine a été décrite comme pouvant contrôler la fréquence du recyclage de l'E-cadhérine. Elle contrôle alors le niveau d'expression de l'E-cadhérine totale à l'intérieur de la cellule ; toutefois certains mécanismes moléculaires précis restent méconnus (20).

2.4 Modulation des jonctions cellulaires par les Rho GTPases

Plusieurs mécanismes moléculaires gouvernent l'adhésion et le contact intercellulaire, tels que les voies de signalisation dépendantes du Ca^{2+} , les phosphorylations des complexes contenant l'E-cadhérine et les voies de signalisation dépendantes des GTPases Rho. Nous nous focaliserons dans cette partie de l'étude sur le dernier mécanisme cité, c'est-à-dire celui dépendant des GTPases.

2.4.1 Modulation par RhoA

La première mise en évidence de la régulation des jonctions d'adhérence par RhoA découle des expériences faites avec les dominants-négatifs ou les formes constitutivement actives. L'utilisation du dominant-négatif de RhoA résulte dans la réduction des filaments d'actine associés aux jonctions et au désassemblage de ces dernières. Les formes constitutivement actives de RhoA, elles, provoquent l'épaississement des filaments d'actine et stabilisent les jonctions. Certains travaux ont montré que les signalisations dépendantes de RhoA modulent l'organisation et l'agrégation des molécules d'E-cadhérine et permettent de recruter certaines protéines cytoplasmiques aux sites de contacts cellulaires. Rho aurait aussi un rôle présumé dans la

formation des filaments d'actomyosine qui stabilisent l'adhésion entre les cellules ou participent à la polarisation des cellules épithéliales (21).

Par ailleurs, il a été montré que la liaison de la p120-caténine avec l'E-cadhérine et donc la formation des jonctions, entraîne une activation de Rac et Cdc42 et une inhibition de RhoA. Un des modèles expliquant ces effets antagonistes sur les différentes GTPases est le suivant : la liaison directe de la p120-caténine avec Rho empêche l'échange du GDP en GTP, d'où l'inhibition de l'activité de Rho et la potentialisation des activités de Rac et Cdc42. Comme seule la p120-caténine non liée à l'E-cadhérine peut inhiber l'activation de Rho, il a été supposé que la densité cellulaire régule la disponibilité de la p120-caténine dans les jonctions cellulaires *via* la modulation de son interaction avec Rho (21).

2.4.2 Modulation par Rac1/Cdc42

Il a été établi que certaines molécules d'adhésion, comme les intégrines par exemple, peuvent jouer un rôle de récepteur. Par analogie, il a été supposé que les cadhérines pouvaient également transduire des signaux vers les GTPases. L'analyse de la localisation intracellulaire des GTPases vient appuyer ce concept puisqu'il a été montré que Rac1/Cdc42 sont retrouvés au niveau des sites des jonctions cellulaires dans des cellules épithéliales. Dans les cellules rénales canines (MDCKII) Rac1 colocalise avec l'E-cadhérine au niveau des sites d'adhésion et transloque dans le cytoplasme lorsque les jonctions sont rompues. Dans les kératinocytes, une étude a mis en évidence une colocalisation de l'E-cadhérine avec Rac1 dans des vésicules (22).

Dans le modèle MDCKII évoqué plus haut, il a été mis en exergue que l'interaction homophile des molécules d'E-cadhérines permettait de recruter Rac1 au niveau du site d'interaction et de l'activer. L'hypothèse mécanistique suggère une possible implication de la PI3K dans l'activation de Rac1 par l'E-cadhérine. Ceci mettrait en jeu un facteur d'échange, tel Tiam1, qui serait sensible aux produits de la PI3K. Dans les cellules épithéliales du cancer du sein MCF7, l'interaction des E-cadhérine aboutit à une activation rapide de Cdc42 (23).

Rac1/Cdc42 peuvent agir directement sur l'assemblage et l'activité des complexes cadhérine/caténine. Un modèle a été proposé dans lequel ces deux GTPases réguleraient les jonctions par l'intermédiaire d'un effecteur commun, IQGAP. Cette dernière a été démontrée interagir avec la β -caténine et l'E-cadhérine et cette interaction serait abolie par l'association d'IQGAP avec les formes actives de Rac1/Cdc42, ce qui stabiliserait les jonctions. A contrario, les GTPases non actives sont incapables d'interagir avec IQGAP qui peut alors s'associer avec la β -caténine au détriment de l' α -caténine. Ceci conduit à la dissociation de l' α -caténine des filaments d'actine, affaiblissant ainsi la capacité d'adhésion de la cellule (24). Selon l'état de la cellule,

Rac1/Cdc42, régulent de manière positive ou négative l'endocytose et le recyclage de l'E-cadhérine, ce qui régulerait également les jonctions d'adhérences. Dans les cellules confluentes où les jonctions sont stables, seul un pool minoritaire d'E-cadhérine est recyclé car le contact cellule-cellule inhibe l'endocytose de l'E-cadhérine. Lorsque les cellules n'établissent pas de contact entre elles, l'E-cadhérine est continuellement endocytée de manière Rac-dépendante, puis recyclé (25).

L'activité des GTPases de la famille Rho et de leurs effecteurs est donc étroitement reliée à l'assemblage et la maintenance des jonctions d'adhésion des cellules. Des voies distinctes de signalisation peuvent être activées en aval des petites GTPases ou coopérer avec celles-ci afin de moduler les jonctions d'adhérence ou activer des cibles qui vont être importants pour le devenir de la cellule.

3 Exemple de voies de phosphorylation impliquées dans la transformation

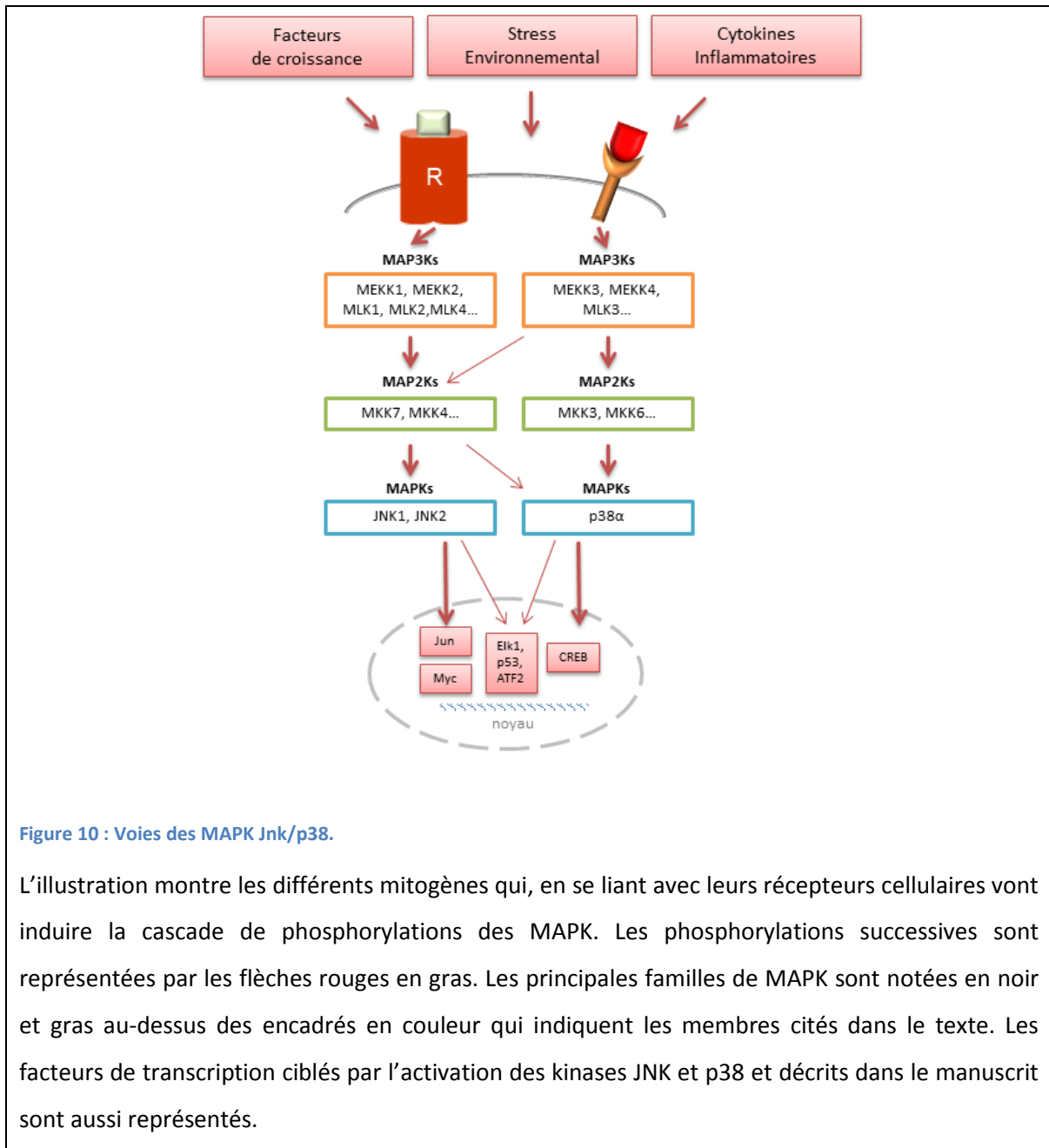
Le remaniement du cytosquelette et la modulation des jonctions d'adhérences, étapes primordiales dans la transformation cellulaire, ont été abordés dans les paragraphes précédents. La dernière partie de ce chapitre est consacrée à l'étude d'exemples de signalisations impliquant des phosphorylations qui peuvent être activées lors de transformation cellulaire.

3.1 La voie JNK/p38

Les voies d'activation des JNK et p38 sont les deux voies de signalisation majeure des MAPKs. Elles sont activées par des cascades de phosphorylation successives de kinases spécifiques : les MAP kinase de kinase kinase (MAP3K) activées *via* les récepteurs membranaires vont phosphoryler et activer les MAP kinase de kinase (MAP2K). Ces dernières vont à leur tour phosphoryler et activer les MAP kinase (MAPK) **Figure 10**.

3.1.1 Les acteurs de la voie

JNK : La famille JNK compte 3 membres JNK1, JNK2, JNK3, issus de la transcription de 3 gènes différents respectivement *MAPK8*, *MAPK9*, *MAPK10*. Des mécanismes d'épissages alternatifs sont à l'origine d'environ une dizaine d'isoformes. JNK1 et JNK2 sont ubiquitaires tandis que JNK3 est exprimée exclusivement au niveau du cerveau. L'activation des kinases JNK nécessite une double phosphorylation sur des motifs Thréonine, catalysée par les MAP2K qui sont les MAP Kinase Kinase 4 et 7 (MKK4, MKK7). Les cibles majeures des JNK sont des facteurs de transcription tels AP1 (constitué du dimère c-jun, c-fos), ou encore STAT3.



p38 : Cette famille compte 4 membres, p38 α , p38 β , p38 γ , p38 δ codés par 4 gènes respectifs : *MAPK14*, *MAPK11*, *MAPK12*, *MAPK13*. Le représentant majeur de la famille est p38 α auquel font référence de nombreuses publications le désignant par p38. Elle est exprimée abondamment dans toutes les cellules à la différence des autres formes qui ont une expression plus tissu-spécifique. La kinase p38 est activée principalement par les MAP2K qui sont MKK3 et MKK6 mais parfois aussi par la MKK4. Les principales cibles de p38 sont des facteurs de transcription tels que : p53, ATF2, Elk1, MEF2 et des kinases telles que : MK2 (MAPK- activated kinase 2), MSK1 (mitogen and stress activated protein kinase 1) etc...(26, 27).

3.1.2 *Contexte physiologique*

Dans les cellules non stimulées, l'activité de JNK2 conduit c-jun à la dégradation tandis que la stimulation active JNK1 qui va alors phosphoryler, stabiliser c-jun et permettre son activation transcriptionnelle (28). La voie JNK/Jun constitue un régulateur négatif de la protéine suppresseur de tumeur p53. JNK possède des effets pro ou anti apoptotique selon le signal reçu et le contexte cellulaire. Une activation transitoire et rapide de JNK favorise la survie cellulaire alors que son activation prolongée provoque l'apoptose.

L'une des fonctions les plus importantes de p38 est celle de régulateur négatif du cycle cellulaire et donc de la prolifération cellulaire *via* divers mécanismes, tels la diminution de l'expression des cyclines ou la modulation de p53. p38 a également un rôle pro-apoptotique dans plusieurs types cellulaires.

En résumé, JNK et p38 exercent des effets antagonistes sur la prolifération et la survie cellulaire, un concept strictement dépendant du type cellulaire dans lequel elles sont exprimées et de la durée ainsi que de l'intensité du stimulus reçu (26, 27).

3.1.3 *Implications pathologiques*

De nombreuses études ont mis en évidence que l'expression ou l'activité des composants des voies de signalisation JNK ou p38 sont souvent modifiées dans les lignées cancéreuses et les tumeurs humaines.

Dans le cancer hépatique, JNK1 détient un rôle oncogénique manifesté par l'augmentation de son activité kinase et la prolifération des cellules cancéreuses. De même, l'augmentation de l'activité de JNK dans les mélanomes humains est due à sa phosphorylation par la PKC (elle-même activée par la signalisation dépendante de la kinase ERK (Extracellular signal regulated kinase). JNK promeut la transformation néoplastique des cellules épithéliales bronchiolaires et est constitutivement activée dans les cellules du cancer du poumon de type NSCLC (Non Small Cell Lung Carcinoma) (29). Plusieurs travaux ont permis d'identifier des cibles de JNK impliqués dans la transformation, c'est le cas de la p21/WAF1. L'activation de JNK via le TGF β conduit à la phosphorylation de p21/WAF1 et sa stabilisation. Par ailleurs, JNK phosphoryle le récepteur à l'androgène dans le cancer de la prostate résultant en l'inhibition des réponses transcriptionnelles dépendantes de ce récepteur (26).

Dans le cas de p38, plusieurs régulateurs négatifs de sa signalisation sont surexprimés dans les tumeurs à l'exemple de l'inhibiteur MAPK3 apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1). Il

a été également décrite une augmentation du niveau de phosphorylation de p38 dans certains lymphomes, cancer du poumon, de la thyroïde et du sein (26).

3.2 La voie Wnt/ β -caténine

La signalisation Wnt/ β -caténine est très importante au cours du développement embryonnaire et des processus de différenciation chez l'adulte. L'acteur clé de cette voie est la β -caténine qui peut permuter de ses fonctions adhésives vers son rôle de co-activateur transcriptionnel dans le noyau.

3.2.1 Implication physiologique

En l'absence de signal, le pool cytoplasmique de β -caténine est maintenu à un niveau très bas par l'action d'un complexe de dégradation incluant : l'Adenomatous polyposis coli (APC), l'Axine, la Casein kinase 1 (CK1) et le Glycogen Synthase Kinase 3 (GSK3 β). Ce complexe envoie la β -caténine vers la dégradation par le système de l'ubiquitination et du protéasome. L'Axine, un adaptateur qui possède des sites de liaison pour la β -caténine, CK1 et GSK3 β , va pouvoir les recruter. CK1 phosphoryle la β -caténine sur la Thr45, cette première phosphorylation est indispensable pour permettre une phosphorylation par la GSK3 β au niveau des résidus Thr41, Ser37 et 33. La β -caténine phosphorylée sur les résidus S33/37 est reconnue par le complexe ubiquitine ligase β -TrcP-E3. A l'aide de l'APC qui présente aussi un site de liaison sur l'Axine, la β -caténine est transférée du complexe vers le protéasome où elle est dégradée (30) **Figure 11** Il est à noter que la β -caténine impliquée dans les jonctions d'adhésion à la membrane n'est pas atteignable par le complexe de destruction. En effet, le domaine d'association avec l'APC et l'Axine est le même que celui nécessaire à l'interaction avec l'E-cadhérine. La β -caténine ne peut donc pas lier simultanément ces différents partenaires (31).

La famille des glycoprotéines sécrétées Wnt est constituée de 19 membres. La liaison de Wnt à son récepteur Frizzled avec les co-récepteurs LRP5/6 entraîne la translocation membranaire de l'Axine. Ce mécanisme conduit à l'inhibition du complexe de destruction de la β -caténine et à sa stabilisation. La β -caténine va alors migrer vers le noyau et activer les facteurs de transcription TCF/LEF qui vont induire divers gènes dont *c-myc*, la *cycline D1* et *l'axine2* (30), **Figure 11.**

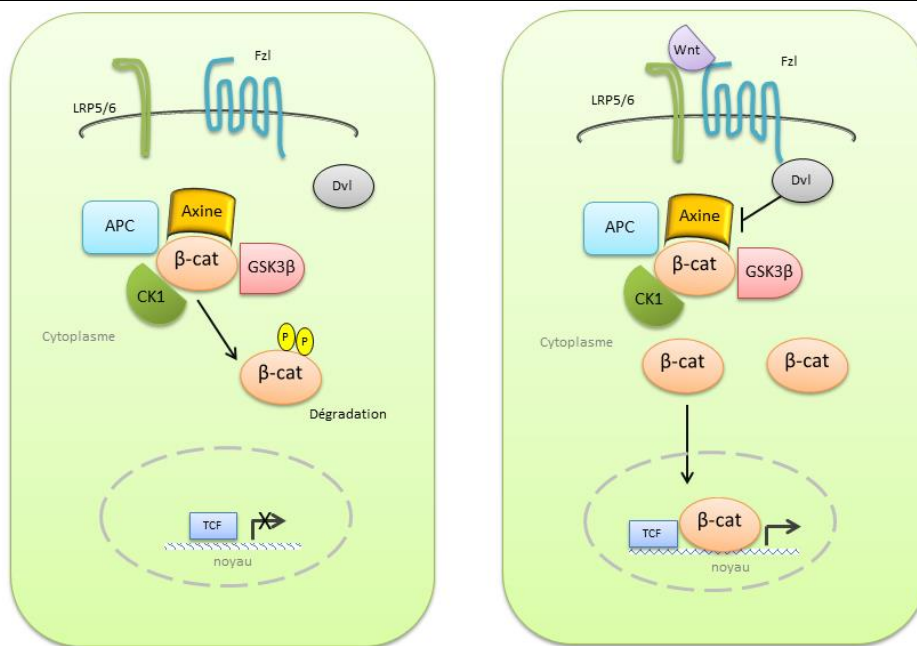


Figure 11 : La Voie Wnt/β-caténine.

En absence du ligand Wnt (cadre de gauche), la β-caténine est phosphorylée puis envoyée à la dégradation via le complexe incluant l’Axine, l’APC, la CK1 et la GSK3β. La liaison de Wnt à son récepteur Fz1 (cadre de droite) entraîne l’inhibition du complexe de dégradation puis la stabilisation de la β-caténine et sa translocation dans le noyau. Au noyau, la β-caténine participe aux complexes

3.2.2 Contexte pathologique

La signalisation Wnt est primordiale au maintien des cellules souches et à la régénération des tissus (exemple, le renouvellement permanent des cellules de l’intestin). Toutefois dans d’autres types cellulaires, après la phase de développement embryonnaire, la signalisation Wnt devient quiescente. L’activation chronique ou inappropriée de la voie Wnt/ β-caténine contribue à l’émergence et à la propagation de nombreuses tumeurs.

Ainsi, 90% des cancers colorectaux sont associés à une activation prononcée et constitutive de la voie Wnt. Cette activation constitutive semble résulter d’une altération du mécanisme de dégradation de la β-caténine. L’absence de dégradation de la β-caténine est souvent induite par des mutations de la β-caténine elle-même ou par des mutations des autres composants du complexe comme l’APC, ou l’Axine. Ces mutations ont été retrouvées dans des carcinomes colorectaux, les mélanomes et les cancers hépatiques. Des mutations dans le domaine N-terminal de la β-caténine qui conduisent à l’accumulation de celle-ci dans le noyau et à l’activation dérégulée de gènes cibles, ont aussi été décrites (32, 33).

PARTIE II : LE PROTO-ONCOGENE VAV1.

Les GTPases possèdent, comme il a pu être souligné dans le premier chapitre, des rôles cruciaux dans le contrôle des fonctions cellulaires qui peuvent être dérégulées dans le cas de cancer. Afin de maintenir l'homéostasie cellulaire et empêcher la transformation, l'activation et les fonctions des GTPases doivent être coordonnées et régulées de manière stricte. Ces critères sont remplis en grande partie par les GEF qui sont les principaux régulateurs des GTPases. Notre laboratoire s'est intéressé plus particulièrement au facteur d'échange Vav1 qui est un régulateur positif de l'homéostasie du système hématopoïétique.

1 Les membres de la famille Vav et expression tissulaire

La famille des protéines Vav est constituée de 3 membres dénommés Vav1, Vav2 et Vav3 chez les mammifères. A la différence, il existe un représentant unique chez les nématodes *CeVav* (*Caenorhabditis elegans*) et chez les insectes *DroVav* (*Drosophila melanogaster*) et aucun représentant chez les plantes (34), **Figure 12**.

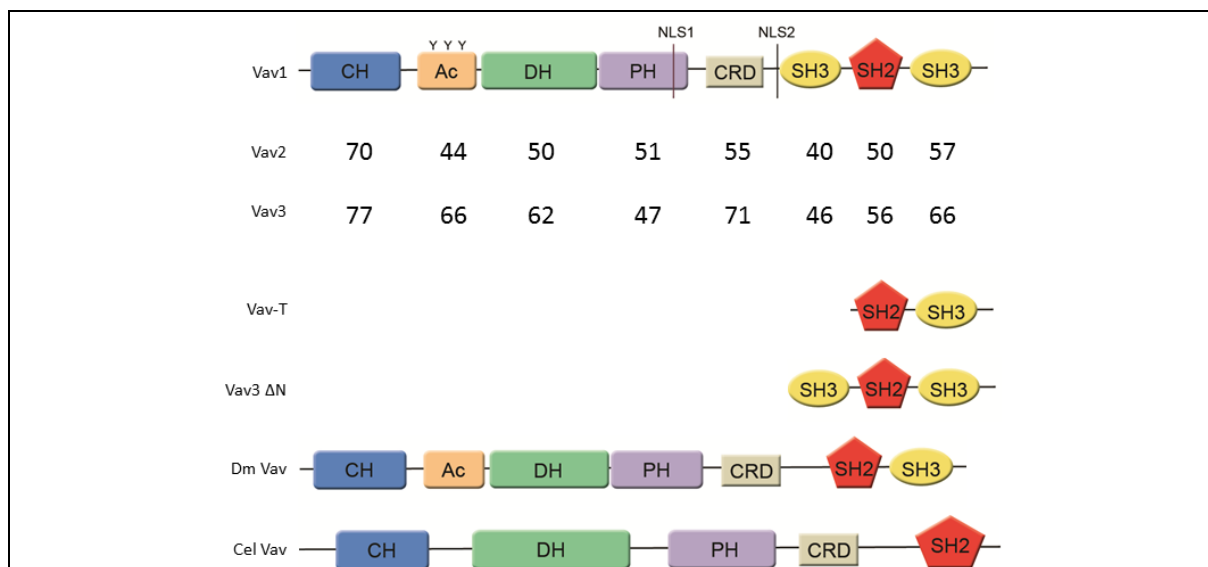


Figure 12 : Structure des protéines de la famille Vav.

Les différents domaines structuraux sont décrits dans le manuscrit. Les chiffres représentent le pourcentage d'homologie des domaines des membres Vav2 et Vav3 par rapport à Vav1. Vav-T et Vav3 ΔN sont des formes tronquées de Vav et Vav3 issues d'épissage alternatif dans certains tissus.

Le premier membre Vav1 a été découvert lors d'expériences visant à isoler des gènes à activité transformante dans les fibroblastes. Cette protéine de 95kDa est restreinte préférentiellement au système hématopoïétique allant des cellules souches pluripotentes, aux formes les plus matures des lignages lymphoïdes, myéloïdes et érythrocytaires (35). Vav2 et Vav3 sont identiques, d'un point de vue séquence en acides aminés, à leur homologue Vav1 à plus de 55% et 70% respectivement. Elles se distribuent de manière ubiquitaire dans plusieurs tissus comme : le foie, la rate, le thymus, le cerveau, le cœur, les reins, les poumons ou encore le placenta. Elles sont exprimées aussi dans les tissus d'origine hématopoïétique mais à un niveau largement plus faible que Vav1 (36, 37).

La littérature a rapporté l'existence de certaines isoformes de Vav1 et Vav2 tel que Vav-T qui est une forme tronquée de Vav1, exprimée dans les testicules de souris et constituée uniquement d'un domaine d'homologie à Src (Src-homology domain 3 : SH3) (38), **Figure 12**. En ce qui concerne Vav2, 3 formes variées de la protéine ont été décrites, et elles sont différentes par la présence d'insertions dans des domaines particuliers (39). Un produit de Vav3 issu d'un épissage alternatif a aussi été mis en évidence : Vav-3 Δ N (37), **Figure 12**.

Les membres de la famille Vav se distinguent donc par leur profil d'expression mais ils partagent la même organisation structurale. Dans ce chapitre, nous nous intéresserons plus particulièrement à Vav1 qui a été démontré comme étant essentiel aux fonctions des lignages hématopoïétiques.

2 Structure de la protéine Vav1

La protéine Vav1 est une protéine multi modulaire constituée de 8 domaines qui sont, en débutant par le côté amino-terminal : un domaine d'homologie à la calponine (CH : Calponin homology domain), un domaine acide (Ac), un domaine d'homologie à la protéine Dbl (DH: Dbl homology domain) organisé en tandem avec un domaine d'homologie à la Pleckstrine (PH : Pleckstrin homology domain) ; une région riche en résidus Cystéine (CRD : cystein rich domain) : trois domaines d'homologie à la protéine Src : un domaine SH2 encadré par deux domaines SH3 (SH : Src homology domain). Vav1 possède également deux séquences de localisation nucléaires (NLS) dont seule celle située à la fin du domaine PH est fonctionnelle et une région riche en résidus proline, **Figure 13**.

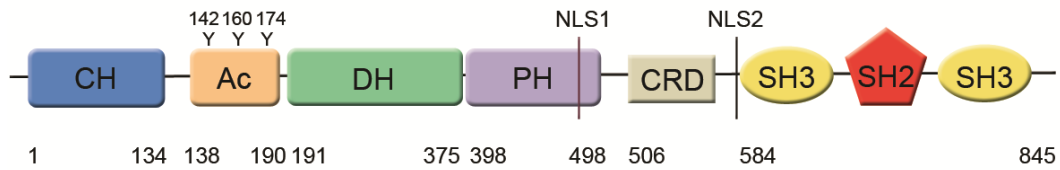


Figure 13 : Structure détaillée de Vav1.

Les différents domaines sont décrits dans le manuscrit. Les chiffres représentent la position des acides aminés correspondants au début et à la fin des domaines dans la séquence codante de Vav1. Les résidus Tyrosine phosphorylés dans la région Acidique sont indiqués par « Y ». La position des deux séquences de localisation nucléaire (NLS) est également notée.

Le domaine CH : c'est une région d'environ une centaine d'acides aminés initialement identifiée dans la protéine calponine qui est un régulateur de la contraction des muscles lisses. Elle caractérise toutes les protéines de liaison à l'actine et les constituants du cytosquelette tels que les filaments intermédiaires (desmine) et la vimentine (40). Les protéines de liaison à l'actine (comme l' α -actinine, la dystrophine, la filamine...) possèdent deux domaines CH disposés en tandem CH1-CH2, formant ainsi un domaine de liaison à l'actine (ABD : Actin Binding Domain). Un seul domaine CH ne possède pas l'affinité suffisante pour lier l'actine (41). Ainsi, dans les protéines comprenant un domaine CH unique (c'est le cas de la calponine elle-même et de Vav1) le domaine CH peut recruter d'autres partenaires et avoir un rôle régulateur (42).

Le domaine Acidique : c'est un motif de 50 acides aminés qui renferme 3 résidus Tyrosine en position 142, 160, 174 qui sont conservés dans de nombreuses espèces de mammifères (chez l'Homme, la souris, le chien...) et non mammifères (drosophile, nématode...). Ces résidus appartiennent tous à un motif consensuel des substrats de la famille des kinases Src : $\phi Yxx\phi$ (où ϕ est soit une Isoleucine, soit une Leucine, soit une Valine et X est un acide aminé quelconque) (43). Ces résidus sont capitaux pour la phosphorylation de Vav1 et permettent son activation en réponse à une stimulation.

Le domaine DH : cette région constituée d'environ 150 acides aminés a été isolée en premier lieu dans l'oncogène Dbl. Elle interagit directement avec les GTPases et renferme l'activité

catalytique nécessaire à l'échange GDP/GTP (44). C'est un domaine qui est commun à tous les facteurs d'échange des GTPases. Cependant, hormis la présence de 3 régions hautement conservées (CR : Conserved Regions), chaque domaine DH des GEFs possède sa propre structure. Ils ne présentent donc que très peu d'homologie entre eux. Comme pour de nombreux GEF, l'activité catalytique du domaine DH de Vav1 est modulée par des interactions intramoléculaires inhibitrices avec les autres domaines (45).

Le domaine PH : le domaine DH est invariablement suivi d'un domaine PH dans toutes les protéines ayant un rôle de facteur d'échange (46). Cette structure d'une centaine d'acides aminés a été originellement identifiée dans le substrat de la PKC, la pleckstrine. C'est un domaine d'interaction avec des phospholipides qui intervient dans l'adressage membranaire et dans la régulation de l'activité d'échange (47).

Les domaines SH3-SH2-SH3 : les régions SH2 et SH3 sont le second et le troisième domaine constituant la protéine Src, le premier étant son domaine catalytique. Ce sont des domaines retrouvés dans la majorité des molécules de signalisation intracellulaire et dans des constituants du cytosquelette. Dans Vav1, cette cassette sert de plateforme d'interaction protéine-protéine favorisant le recrutement d'effecteurs et de messagers intra cytoplasmiques. Le domaine SH3 situé du côté N-terminal présente des divergences avec la séquence canonique connue pour les domaines SH3. En revanche le domaine SH3 du côté C-terminal présente une séquence consensuelle avec celle déterminée pour Src (48).

Vav1 comporte donc de nombreux domaines, qui pour la plupart sont des structures communes à beaucoup d'autres molécules de signalisation et protéines du cytosquelette. Cependant elle présente la particularité d'avoir à la fois des domaines DH-PH et le domaine SH2 au sein de sa structure. La présence du domaine riche en cystéine régulant l'activité du domaine DH-PH est aussi propre à Vav1. Ces critères uniques, associés aux multiples domaines qu'elle renferme, suggèrent des fonctions importantes tenues par Vav1 dans la cellule.

3 Principales fonctions

La présence du tandem DH-PH et de la cassette SH3-SH2-SH3 dans la structure de Vav1 lui confère deux principales fonctions : celle de facteur d'échange nucléotidique et d'adaptateur, **Figure 14.**

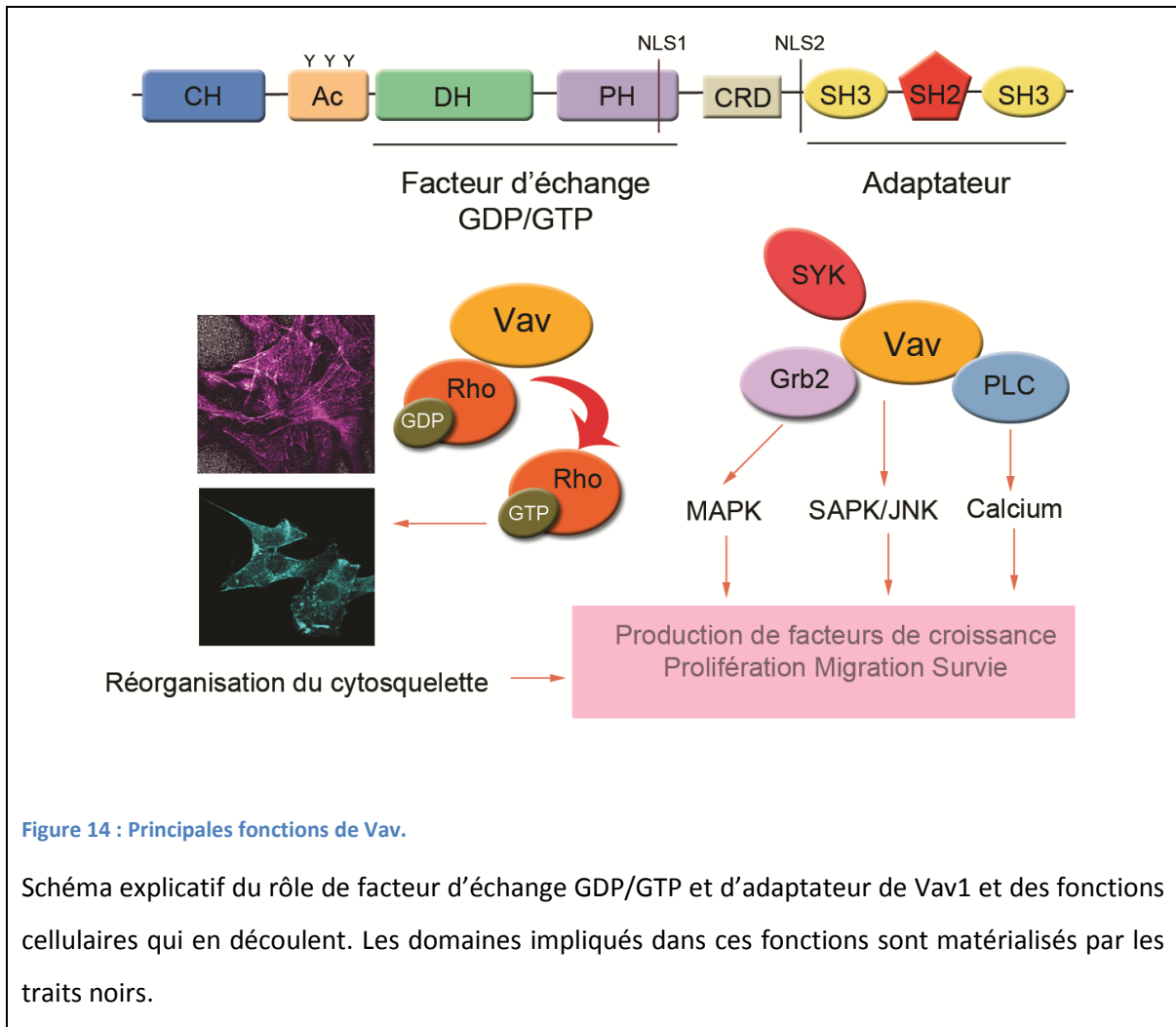


Figure 14 : Principales fonctions de Vav.

Schéma explicatif du rôle de facteur d'échange GDP/GTP et d'adaptateur de Vav1 et des fonctions cellulaires qui en découlent. Les domaines impliqués dans ces fonctions sont matérialisés par les traits noirs.

3.1 Fonction de facteur d'échange du GDP/GTP

3.1.1 Les substrats de Vav

Les protéines Vav sont décrites pour exercer une activité d'échange nucléotidique sur la famille des GTPases Rho. Contrairement à certains facteurs d'échange spécifiques d'une seule GTPase (exemple : Tiam1/Rac1), plusieurs études ont défini un large spectre de substrats possibles pour Vav1 tels que Rac1, RhoA, Cdc42, principalement (49-51), mais aussi Rac2, RhoB, RhoG (52, 53). En ce qui concerne la GTPase Ras, des résultats opposés ont été obtenus dans différentes études. Dans le modèle de fibroblaste NIH3T3, l'équipe du Dr. Altman a démontré que la phosphorylation de Vav1 par la kinase Lck ou son activation par le *Phorbol Myristate Acetate* (PMA), induit une stimulation de son activité d'échange sur Ras (54, 55). Ces résultats sont contestés par l'équipe du Dr. Bustelo qui démontre l'absence d'activité d'échange de Vav1 sur Ras. Il propose plutôt une coopération entre les deux protéines dans la transformation des fibroblastes NIH3T3 (56). Les études dans des modèle à la fois lymphoïdes (DT40 : une lignée de cellules B) et fibroblastiques (COS : issus du singe) ont mis en évidence que Vav1 stimule

l'activation du facteur d'échange de Ras, Ras GRP1, ce qui conforte ainsi l'hypothèse de la coopération entre Vav1 et Ras (57).

3.1.2 Spécificité et base structurale de la réaction d'échange

Le domaine DH de Vav1 lui permet de reconnaître les GTPases de la famille Rho et agir sur les régions *switch* de ces dernières pour l'échange nucléotidique. De manière générale, la spécificité de reconnaissance des GTPases est déterminée par l'interaction du domaine DH avec la région $\beta 2/\beta 3$ de celles-ci (58). Vav1 ne déroge pas à cette règle, tel que le montre les travaux de Movilla *et al*, sur Vav3. Le facteur d'échange Vav3 est connu pour avoir comme substrat préférentiel RhoA, RhoG, Rac1 et pas Cdc42, et permet donc de comprendre à l'échelle structurale la spécificité de substrat des protéines Vav. Dans cette étude, N. Movilla et ses collègues ont mis en évidence qu'au moins deux résidus sont critiques pour la liaison spécifique de la GTPase à Vav et pour l'échange nucléotidique : l'acide aspartique D49 (situé dans la boucle reliant $\beta 2/\beta 3$) et l'acide glutamique E54 (situé dans le feuillet $\beta 3$). Ces résidus étant conservés parmi les membres de la superfamille Ras, excepté dans la sous famille Cdc42, ils constitueraient les déterminants structuraux utilisés par Vav pour discriminer ses substrats spécifiques (59).

Les données structurales disponibles sur le complexe formé par le domaine DH-PH-CRD de Vav1 et la GTPase Rac1, malgré quelques divergences, pointent toutes vers un rôle important du domaine CRD dans la spécificité de la réaction d'échange. Les deux travaux, respectivement de J. Heo en 2005 et de l'équipe de Peter Khun, ont mis en avant un rôle actif de la région CRD dans la liaison initial à Rac1 et l'activité d'échange médiée par Vav1 (60, 61). Dans leurs travaux, ces deux équipes ont mis en évidence une capacité du domaine CRD (même seul) à lier la GTPase Rac1. Par ailleurs, une étude complémentaire de l'équipe de P. Khun en 2008, sur le complexe Vav1 DH-PH-CRD et Rac1, a révélé un réseau de contact entre la région CRD et une hélice située en carboxy-terminal du domaine DH de Vav1. Cette interaction permet la stabilisation du domaine DH et son association avec la région *switch II* de Rac1 pour déplacer le nucléotide (62), **Figure 15**.

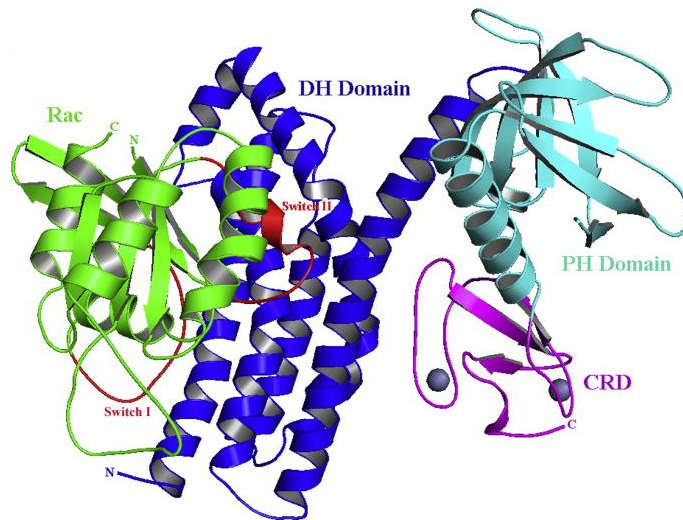


Figure 15 : Premier modèle de la structure de Rac1 complexé avec les domaines DH-PH-CRD de Vav1.

La région DH est représentée en bleu, la région PH en cyan, la région riche en cystéine (CRD) en violet et Rac1 en vert. On distingue l'interaction des deux régions *switch* de Rac1 (en rouge) avec les hélices du domaine DH de Vav1. (D'après Chrencik et *al*, 2008).

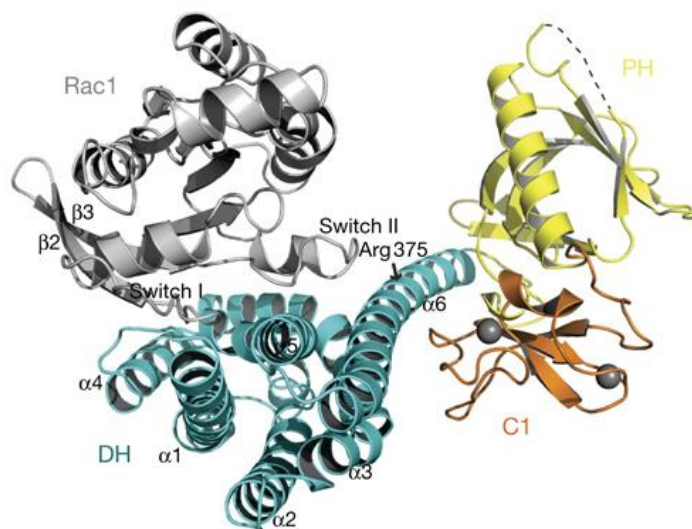


Figure 16 : Deuxième modèle de la structure de Rac1 complexé avec les domaines DH-PH-CRD de Vav1.

La région DH est représentée en bleu, la région PH en jaune, la région C1 en orange et Rac1 en gris. Les feuillets B2/B3 du domaine G de Rac1 sont indiqués ainsi que les hélices constituant le domaine DH de Vav1. Les deux régions *switch* de Rac1 interagissent avec les hélices du domaine DH de Vav1. (D'après Rapley et *al*, 2008).

Les travaux de Rapley *et al*, publiés en même temps que ceux de l'équipe de P. Kuhn, ont complété le modèle structural de la réaction d'échange. Ils ont montré que le domaine PH forme avec la région CRD, une structure unique qui vient se positionner sur l'hélice au niveau carboxy-terminal du domaine DH afin de stabiliser la conformation de ce domaine et permettre l'échange nucléotidique. En revanche, à la différence des autres études, J. Rapley et ses collègues n'observent pas de contacts directs entre la région CRD et Rac1 (63), **Figure 16**.

3.2 Fonction adaptatrice

Les adaptateurs sont des protéines de signalisation dépourvus d'activité catalytique propre mais qui permettent des interactions protéine-protéine. Ainsi, les adaptateurs participent à la formation de complexes hétéro moléculaires ou signalosomes qui vont pouvoir relayer les signaux extracellulaires vers leurs cibles intracellulaires. Les adaptateurs sont le plus souvent des protéines multi modulaires et le recrutement de partenaires se fait notamment par l'intermédiaire des domaines d'homologie à Src SH2 et SH3.

3.2.1 Spécificité du domaine SH2

Les domaines SH2 ont été initialement définis comme étant une séquence conservée d'environ une centaine d'acides aminés, qui régule l'activité kinase des membres de la famille de tyrosine kinase Src. Les domaines SH2 reconnaissent spécifiquement des motifs portant des tyrosines phosphorylées avec des séquences primaires distinctes. Les résidus qui suivent directement la tyrosine phosphorylée du côté C-terminal (c'est-à-dire en position +1, +2 ou +3), déterminent la spécificité des motifs reconnus. Les différents groupes de domaine SH2 sont répertoriés selon l'acide aminé qui est à la position analogue à la position β D5 du domaine SH2 de Src (64). Par exemple, la moitié des domaines SH2 connus possède une Tyrosine ou une Phénylalanine en position β D5 et constitue le groupe I. Leur sélectivité est déterminée par l'acide aminé en position +1 et +3. Le domaine SH2 de Vav fait partie du groupe II car il possède une Thréonine à la position β D5 et sélectionne les phosphopeptides selon la présence d'une Méthionine ou une Leucine ou une Glutamine en position +1. Le motif optimal reconnu par le domaine SH2 de Vav est la séquence phosphoTyr-Met-Glu (65).

3.2.2 Spécificité du domaine SH3

Les domaines SH3 comportent environ 60 à 70 acides aminés et sont constitués de feuillet β (notés β 1 à β 5 connectés par des boucles courtes). 3 brins β sont disposés de manière antiparallèle afin de former deux feuillet perpendiculaires. Les domaines SH3 s'associent à des protéines contenant des séquences riches en résidus proline. Le motif de reconnaissance minimal

unanimement reconnu étant une séquence PxxP où -x- peut être n'importe quel acide aminé (66). Le peptide comprenant ce motif PxxP adopte le plus souvent une conformation en hélice, ce qui lui permet de se positionner dans le domaine SH3 avec une orientation bien spécifique. L'orientation choisie dépend de la présence d'acide aminé basique, soit dans la région N-terminale, soit dans la région C-terminale du motif PxxP. Il existe donc deux possibilités d'orientation du peptide dans le domaine SH3, définissant ainsi les différentes catégories:

- Les domaines SH3 de la classe I lient les peptides du côté N-terminal vers le côté C-terminal, c'est-à-dire dans le sens RxxPxxP.
- Les domaines SH3 de la classe II lient les peptides du côté C-terminal vers le côté N-terminal, c'est-à-dire dans le sens xPxxPxR.

Les domaines SH3 peuvent aussi s'associer à des motifs proline atypiques, comme une séquence PxxDY, plutôt que la séquence usuelle PxxP. Il existe aussi des motifs de liaison aux domaines SH3 ne comportant pas de résidus proline ; c'est le cas du motif RKxxYxxY présent dans une protéine adaptatrice, la SKAP55 (67).

4 Partenaires fonctionnels de Vav1 et adressage subcellulaire

La diversité des domaines structuraux de Vav1 lui permet de lier plusieurs types de partenaires aussi bien des récepteurs membranaires, que des effecteurs cytoplasmiques et des partenaires nucléaires **Figure 17**. L'interaction de Vav1 avec ces différents partenaires va conduire une localisation variable de Vav1 au sein de la cellule.

4.1 Exemple de récepteurs activateurs et recrutement à la membrane

Plusieurs travaux antérieurs ont démontré que Vav1 pouvait être phosphorylée et activée en réponse à la stimulation de divers récepteurs de surface appartenant à des types moléculaires variés. Cette phosphorylation de Vav1 peut conduire à sa relocalisation et sa participation dans des complexes juxta-membranaires.

4.1.1 Les récepteurs immuns

Les récepteurs aux antigènes sont caractérisés par l'absence d'activité catalytique propre et s'associent avec des sous-unités ou corécepteurs. Ces corécepteurs présentent des motifs particuliers à base de Tyrosine ou Immunoreceptor Tyrosine based Activation Motif (ITAM). Ces motifs sont présents dans la partie cytoplasmique des co-récepteurs associés au TCR (CD3, TCR ζ) ou au BCR (Ig α , Ig β) et dans le segment intracellulaire de la chaîne beta et gamma des Récepteurs du Fragment Fc des IgE (RFc ϵ I). L'engagement spécifique des récepteurs immuns entraîne la

phosphorylation, par les kinases de la famille Src (Lyn, Fyn), des ITAMs. Ces derniers vont servir de site d'ancrage pour les kinases de la famille Syk/ZAP70 qui vont pouvoir recruter et phosphoryler plusieurs protéines dont Vav1 (68, 69).

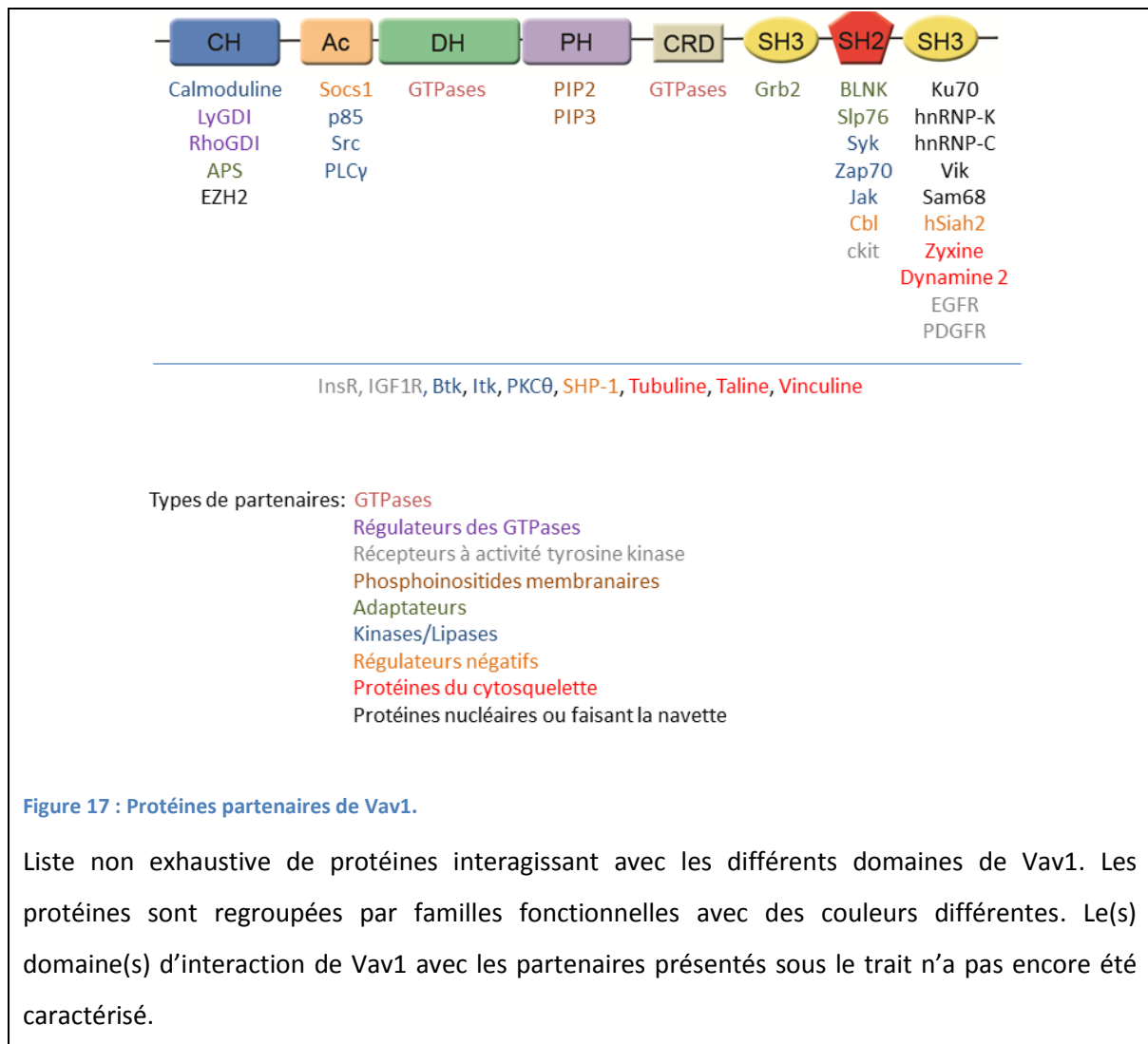


Figure 17 : Protéines partenaires de Vav1.

Liste non exhaustive de protéines interagissant avec les différents domaines de Vav1. Les protéines sont regroupées par familles fonctionnelles avec des couleurs différentes. Le(s) domaine(s) d'interaction de Vav1 avec les partenaires présentés sous le trait n'a pas encore été caractérisé.

4.1.2 Les récepteurs aux facteurs de croissance

Des études *in-vitro* ont permis d'établir la participation de Vav1 à des voies de signalisation régulées par les récepteurs aux facteurs de croissance. Dans cette catégorie, il a été montré que Vav1 pouvait être phosphorylée et activée en aval de récepteurs à l'érythropoïétine, à la thrombopoïétine, à diverses cytokines (interleukine : IL-2, IL3, IL-5, IL-6 et interférons : IFN). A la différence des récepteurs immuns, qui signalent pour la grande majorité *via* les kinases de la famille Syk/Zap-70, les récepteurs aux facteurs de croissance requièrent l'activité des kinases de la famille Jak (34, 70).

4.1.3 Les récepteurs à activité tyrosine kinase

Lors des premières expériences de caractérisation de Vav1 après sa découverte, il a été mis en évidence que Vav1 pouvait être phosphorylée en réponse à la stimulation de récepteurs dotés d'activité tyrosine kinase intrinsèque. Par exemple, la liaison du « Stem Cell Factor » (SCF) à son récepteur c-kit, exprimée notamment dans les cellules stromales de la moelle épinière, entraîne la phosphorylation de Vav1 (71). L'expression ectopique de Vav1 dans les cellules fibroblastiques NIH3T3 permet sa phosphorylation en réponse à la stimulation des récepteurs aux facteurs de croissance : « Epithelial Growth Factor Receptor » (EGFR) et « Platelet Derived Growth Factor Receptor » (PDGFR). Il a été souligné que Vav1 pouvait s'associer à ces récepteurs activés *via* son domaine SH2 (72). Enfin, la stimulation du récepteur à l'insuline présent dans les cellules hématopoïétiques, entraîne la phosphorylation de Vav1 et son association *in-vitro* à la sous unité β du dimère composant ce récepteur (73).

4.2 Exemples de partenaires et effecteurs cytoplasmiques

En absence de stimulation, Vav1 est localisée de manière prédominante dans le cytoplasme, quel que soit le type cellulaire étudié : lignages hématopoïétiques ou modèles fibroblastiques. Plusieurs types de partenaires interagissent avec Vav1 dans le cytoplasme : des kinases ou lipases, des adaptateurs, des composants du cytosquelette et des régulateurs des GTPases, **Figure 17**. Ces partenaires vont exercer diverses fonctions, telles la régulation de l'activité de Vav1 ou sa localisation ainsi que le rôle d'effecteur véhiculant le signal intracellulaire relayé par Vav1.

Parmi les kinases régulatrices de l'activité de Vav1, on peut citer : les kinases de la famille Syk, Zap-70 qui interagissent avec Vav1 au niveau de son domaine SH2 et les kinases de la famille Tec (Tec elle-même et Itk) (74-76).

Vav1 interagit aussi avec de nombreuses protéines adaptatrices dont la plus caractérisée est la protéine Grb2. Le recrutement de Vav1 *via* son domaine N-SH3 par l'adaptateur Grb2 aboutit à l'association de Vav1 avec le corécepteur CD28 et l'adaptateur LAT (Linker of Activated T cell). Ces deux molécules favorisent la translocation de Vav1 à la membrane plasmique et son interaction avec des tyrosines kinases dans les lymphocytes T (77, 78).

Vav1 peut également s'associer à des protéines essentielles du cytosquelette et les moduler, comme les filaments d'actine, la tubuline qui constitue les microtubules (79), mais aussi la zyxine, la vinculine, la taline et la dynamine 2, qui sont des protéines à rôle plus spécifique dans le cytosquelette (80, 81).

Vav1 se lie avec des lipases, ainsi qu'avec des sous unités spécifiques de certaines kinases qui ont un rôle effecteur des fonctions de Vav1. En guise d'exemple, il a été démontré que Vav1 interagit, *via* son domaine CH, avec la phosphatase calmoduline. Cette interaction permet à Vav1 de réguler le flux calcique intracellulaire en réponse à la stimulation du TCR (42). Dans des cellules primaires T et dans le modèle Jurkat, après stimulation, Vav1 se lie avec la sous unité α de la kinase « I kappa B Kinase » (IKK) impliquée dans la phosphorylation et l'activation du facteur de transcription NF κ B (82). Vav1 interagit aussi avec la sous unité régulatrice p85 de la kinase PI3K et avec la phospholipase PLC γ (83, 84). Celles-ci sont des effecteurs importants de la signalisation intracellulaire dépendante de Vav1.

Il a été mis en évidence que Vav1 interagissait aussi avec des régulateurs des GTPases : Ly-GDI (un GDI spécifique de Rac) et Rho-GDI (85). Les analyses fonctionnelles ont démontré notamment, que l'interaction de Vav1 avec le Ly-GDI régule de manière fine les voies de signalisation menant à l'activation du facteur de transcription NFAT dans les lymphocytes T (86).

4.3 Exemple de partenaires nucléaires et adressage au noyau

Il a été noté que lors de la stimulation de certains récepteurs des cellules hématopoïétiques, Vav1 peut transloquer au noyau. Par exemple, la stimulation du récepteur à la prolactine (PRLr : Prolactin Receptor) induit la translocation nucléaire de Vav1 dans un modèle de lignée T (87). Vav1 est également dirigée au noyau en réponse à la stimulation par l'interféron de lignée mégacaryocytaire (70). Vav1 est par ailleurs détectée de manière prépondérante dans le noyau, après stimulation prolongée des récepteurs de haute affinité pour l'IgE dans la lignée RBL-2H3, une lignée de basophile issue du rat (88).

Il n'est donc pas étonnant que le crible des partenaires potentiels de Vav1 ait mené à l'identification de partenaires nucléaires variés. Ainsi, dans des cellules hématopoïétiques, Vav1 interagit *via* son domaine CSH3 avec des protéines de liaison à l'ARN : hnRNPK et hnRNPC (heterogeneous RiboNucleoProtein). Ces protéines sont impliquées dans la biogenèse des ARN dont elles permettent la maturation, la régulation de l'épissage et l'export (89, 90). Vav1 a été aussi montrée interagissant avec la protéine nucléaire Ku70 dans des modèles lymphocytaires (Jurkat) et mégacaryocytaire (UT-7). La protéine Ku70 est un des constituants du complexe DNA-dépendante de protéine kinase (DNA-PK : DNA-dependant Protein Kinase). Ce complexe est impliqué, entre autre, dans les processus de réparation et de réplication de l'ADN (91). Enfin, Vav1 est un partenaire de la protéine « Src-associated protein in mitosis of 68KDa » (SAM68), une protéine de liaison à l'ARN. SAM68 joue un rôle dans la modulation post-transcriptionnelle *via* la transduction des signaux importants pour la régulation de l'ARN. La co-

expression de Vav1 et de SAM68 dans les cellules Jurkat favorise la présence de Vav1 dans le noyau (92).

5 Modulation fonctionnelle de Vav1

Plusieurs mécanismes moléculaires modulent les fonctions de Vav1 au sein de la cellule. Nous verrons quelques exemples dans ce paragraphe.

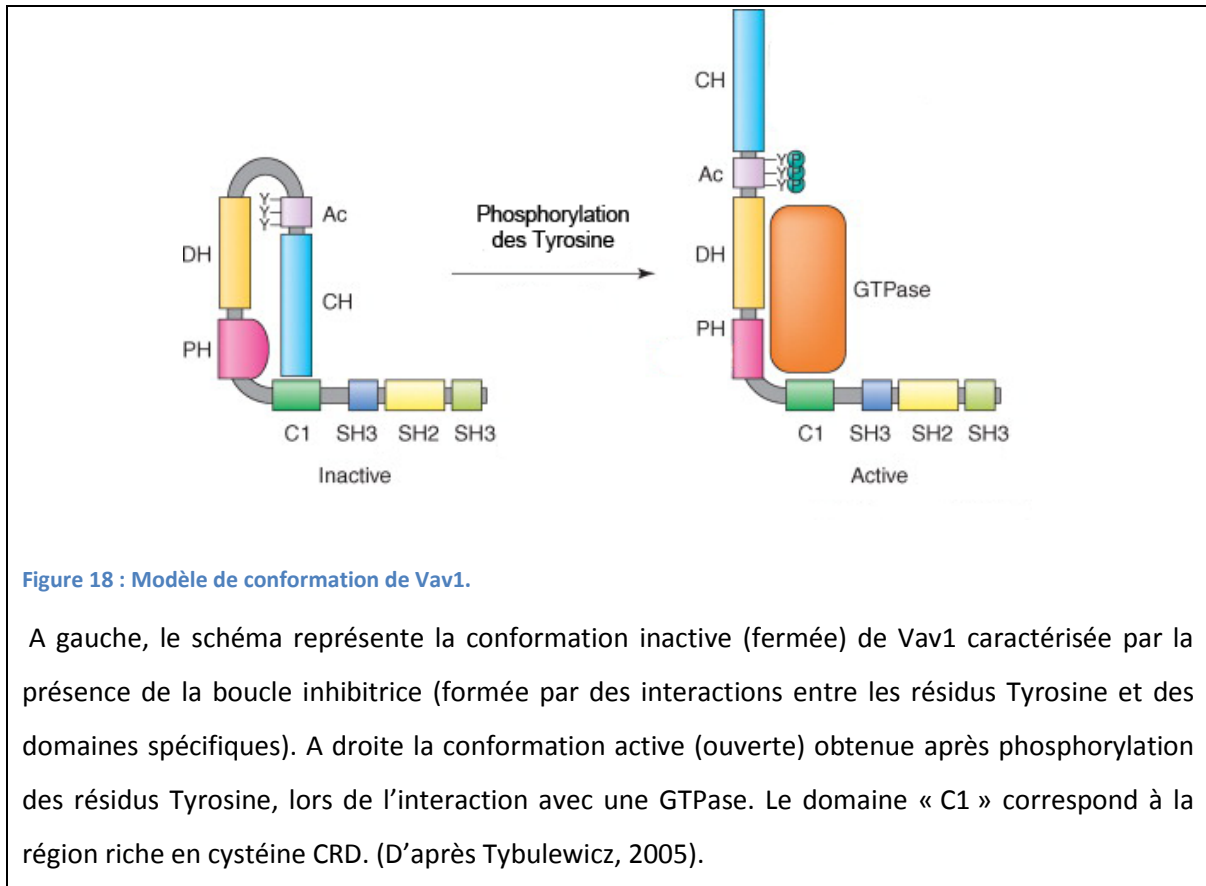
5.1 Rôle de la phosphorylation et du changement de conformation dans l'activation de Vav1

Vav1 se différencie des autres facteurs d'échange par le fait que c'est le seul dont l'activité d'échange nucléotidique est strictement régulée par phosphorylation. Cette phosphorylation peut se faire, comme nous l'avons vue dans les paragraphes précédents, *via* son association aux récepteurs dotés d'activité tyrosine kinase. Lorsque les récepteurs sont dépourvus d'activité tyrosine kinase, ce sont les kinases cytoplasmiques qui vont permettre de phosphoryler Vav1.

L'ensemble des études réalisées a permis de distinguer deux familles principales de kinases cytoplasmiques, impliquées dans la phosphorylation de Vav1 dans les cellules hématopoïétiques : la famille Syk/ZAP70 et la famille des kinases Jak (en page 43). La kinase Syk est exprimée préférentiellement par les lymphocytes B, les basophiles et les cellules « Natural Killer » (NK), tandis que l'expression de ZAP70 est prépondérante dans les lymphocytes T. Ces kinases sont activées par recrutement au niveau des motifs ITAMs des corécepteurs aux antigènes. Les protéines de la famille Jak sont des kinases associées constitutivement à la portion cytoplasmique des récepteurs aux cytokines. La liaison de cytokines à leurs récepteurs entraîne une agrégation de ceux-ci puis la phosphorylation des kinases Jak entre elles, ce qui permet le recrutement *via* son domaine SH2 de Vav1 (34).

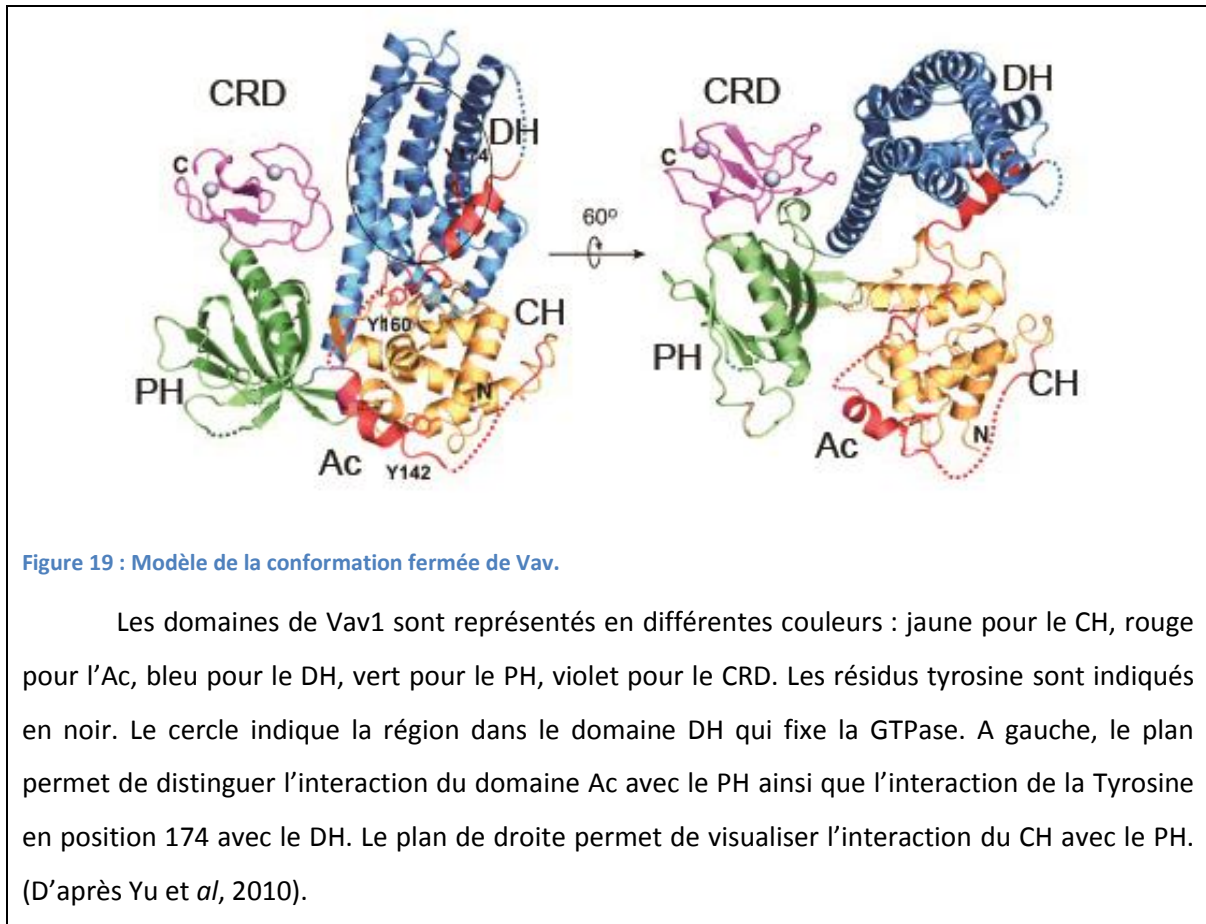
Parmi les 3 résidus Tyrosine du domaine Ac, le résidu situé en position 174 est le seul conservé parmi les membres de la famille Vav. La phosphorylation de ce résidu, en réponse à la stimulation des récepteurs membranaires, est critique pour les fonctions de Vav1 (93). Des études faites dans une lignée déficiente en Vav1 (J.Vav) reconstituée avec différents mutants des résidus Tyrosine ont souligné le rôle régulateur de la Tyrosine Y174 dans la fonction GEF de Vav1 et sa redistribution lors de l'activation du TCR (94). Les travaux d'Aghazadeh *et al* ont mis en évidence l'existence d'une boucle auto inhibitrice constituée par l'interaction du résidu Y174 avec un acide aminé dans le domaine DH qui maintient Vav1 dans une position fermée. La phosphorylation de la

Tyrosine 174 rompt cette interaction conduisant à la déstructuration du domaine DH et à l'acquisition d'une conformation ouverte apte à l'activité catalytique d'échange (95) **Figure 18**.



L'ensemble des travaux de M. Rosen et coll. a contribué à étayer ce modèle de changement conformationnel de Vav1 associé à la phosphorylation. En 2005, ils avaient découvert que la boucle inhibitrice était constituée précisément du site actif du domaine DH, relié à une hélice α centrée autour de la Tyrosine 174 de la région Ac. Seul le résidu Y174 est masqué et protégé de la phosphorylation car les deux autres résidus Y142 et Y160 restent exposés. Ils ont montré *in-vitro*, que ces résidus constituent des points d'accès pour les kinases. En particulier, la phosphorylation du résidu Y142 procure un site d'ancrage pour la kinase Lck et multiplie la capacité de cette kinase à phosphoryler la tyrosine 174 (43). Cette observation est cohérente avec les résultats obtenus par Miletic *et al* dans leur lignée J.Vav1. Ils ont en effet noté que la mutation ponctuelle d'un des 3 résidus (Y142, Y160, Y174) n'a pas d'impact majeur sur la phosphorylation de Vav1. *A contrario*, la mutation combinée de ces 3 résidus abolit totalement cette phosphorylation (94). Une étude structurale plus récente a complété le modèle de « conformation fermée » de Vav1 à l'état de repos. Des interactions additionnelles contribuent au maintien de cette conformation : celle du domaine CH avec le domaine PH, celle des deux autres

résidus Y142, Y160 de la région Ac avec le domaine DH, celle du domaine Ac avec le domaine PH (96), **Figure 19**.



Par ailleurs, des études biochimiques et biologiques ont mis en évidence l'implication du domaine CRD et du domaine CH dans le mécanisme de régulation de Vav1. La délétion du domaine CH donne une protéine Vav1 hautement transformante, même lorsque le domaine Ac est intact. Il apparaît donc que le domaine CH possède un rôle régulateur négatif qui est exercé *via* son interaction avec la région CRD. Ainsi l'activation de Vav1 impliquerait une rupture simultanée de l'interaction du domaine CH avec la région CRD puis de l'interaction de la région Ac avec le domaine DH (97). Ce modèle alternatif de régulation est appuyé par l'observation structurale montrant que l'activation de Vav1 induit aussi des changements dans l'orientation de la région CRD par rapport aux autres domaines de la cassette DH-PH-CRD (96).

5.2 Régulation négative des fonctions de Vav1

Si les mécanismes d'activation de Vav1 sont maintenant bien illustrés dans la littérature, les mécanismes de régulation négative de l'activité de Vav1 sont moins bien décrits. Parmi les régulateurs négatifs les mieux caractérisés de Vav1, on retrouve la phosphatase SHP-1 et l'ubiquitine ligase Cbl-b.

La protéine SHP-1 fait partie de la superfamille des Protéines Tyrosines Phosphatases qui, par leur action de déphosphorylation, régulent négativement les voies de signalisation intracellulaire. Des expériences ont montré une interaction indirecte de Vav1 avec SHP-1, faisant intervenir le récepteur CD22, ce qui entraîne une inactivation de la phosphorylation de Vav1 induite par le récepteur à l'antigène des cellules B. La déphosphorylation de Vav1 par SHP-1 semble aussi être une étape clé dans la modulation de la signalisation menant à la mort cellulaire des cellules B (98). De même dans les cellules NK, lors de leur interaction avec leurs cellules cibles, Vav1 est retrouvée associée au site catalytique de SHP-1. Ainsi, l'inhibition de l'activité cytotoxique des cellules NK passe par une étape primaire de déphosphorylation de Vav1 par SHP-1(99, 100).

Les protéines de la famille Cbl interviennent dans l'ubiquitination et la dégradation des protéines de signalisation autour des récepteurs à activité tyrosine kinase, des récepteurs aux antigènes et des cibles en aval des tyrosines kinases, comme c'est le cas de Vav1 (101). Cbl-b, un des membres de la famille Cbl, a été trouvé partenaire de Vav1. Des expériences basées sur la suppression du gène codant pour Cbl-b ont suggéré son implication dans la régulation négative de Vav1. La suppression de Cbl-b augmente significativement l'activation de Vav1 indépendamment de l'engagement du récepteur à l'antigène des cellules T et du CD28 (102). D'autres expériences sur des cellules T immortalisées dérivées de souris *knockout* pour Cbl, ont démontré que Vav1 phosphorylée pouvait être ubiquitinée par Cbl-b. Le processus d'ubiquitination nécessite une association de Vav1 à la Tyr-700 phosphorylée de Cbl-b qui présente un domaine RING-finger conservé parmi les E2 ligases de l'ubiquitination (103).

D'autres protéines partenaires de Vav1, caractérisées lors d'expériences de double-hybride chez la levure et de co immunoprécipitations, régulent négativement Vav1. Pour exemple, la protéine Socs1, un inhibiteur des kinases Jak, possède également la propriété de promouvoir l'ubiquitination et la dégradation de Vav1 *via* le protéasome. Ceci nécessite l'interaction du domaine SH2 de Socs1 avec le domaine SH2 de Vav1, indépendamment d'une phosphorylation (104). De même, la ligase hSiah-2, un autre composant des complexes d'ubiquitination, régule négativement Vav1 et les voies activées par celle-ci (comme la voie JNK et la voie NFAT). Cette régulation met en jeu une interaction des domaines d'homologie à Src de Vav1 ainsi que la région C-terminale de hSiah-2 mais elle n'aboutit pas à la dégradation de Vav1 par le protéasome (105).

6 Relevance physiologique de Vav1

Vav1 est un élément central de nombreuses voies de signalisations importantes dans les cellules hématopoïétiques. Vav1 assure l'intégration du signal reçu au niveau de plusieurs types de récepteurs immuns et sa transmission vers les molécules effectrices en charge d'initier les réponses cellulaires appropriées. Nous nous baserons, dans ce travail, essentiellement sur l'exemple des lymphocytes T.

6.1 Un acteur clé dans la signalisation lymphocytaire

6.1.1 Rôle sur la formation de la synapse immunologique

La reconnaissance d'un antigène spécifique par un récepteur immun est caractérisée par la formation d'une structure particulière : la synapse immunologique. Initialement mis en évidence dans les lymphocytes T, la formation de la synapse immunologique semble être aussi une étape importante dans l'activation de la majorité des cellules immunes. Dans le cas des lymphocytes T, cette étape nécessite la reconnaissance spécifique par les molécules associées au TCR, du peptide antigénique à la surface d'une cellule présentatrice d'antigène (CPA) ; c'est la formation du conjugué initial « lymphocyte T-CPA ». Elle nécessite également une interaction entre l'intégrine LFA-1, présente à l'état inactif dans le lymphocyte (LFA-1 : Lymphocyte function-associated antigen 1) et son ligand ICAM-1 présent à la membrane de la CPA (ICAM-1 : Intercellular Adhesion Molecule 1). La zone de contact étroite ainsi formée permet de maintenir l'interaction entre le lymphocyte et la cellule cible et d'assurer la réception des signaux de co-stimulation nécessaires à l'activation des lymphocytes T **Figure 20**.

La synapse immunologique encore appelée supramolecular activation cluster (SMAC), est organisée en deux zones discrètes :

- Une zone centrale comprenant les récepteurs aux antigènes (TCR par exemple), leurs corécepteurs (CD2, CD4, CD28) et certaines kinases (PKC θ)
- Une zone périphérique concentrée en intégrines (LFA-1, ICAM-1) et d'autres protéines (le CD45, la Taline), **Figure 20**.

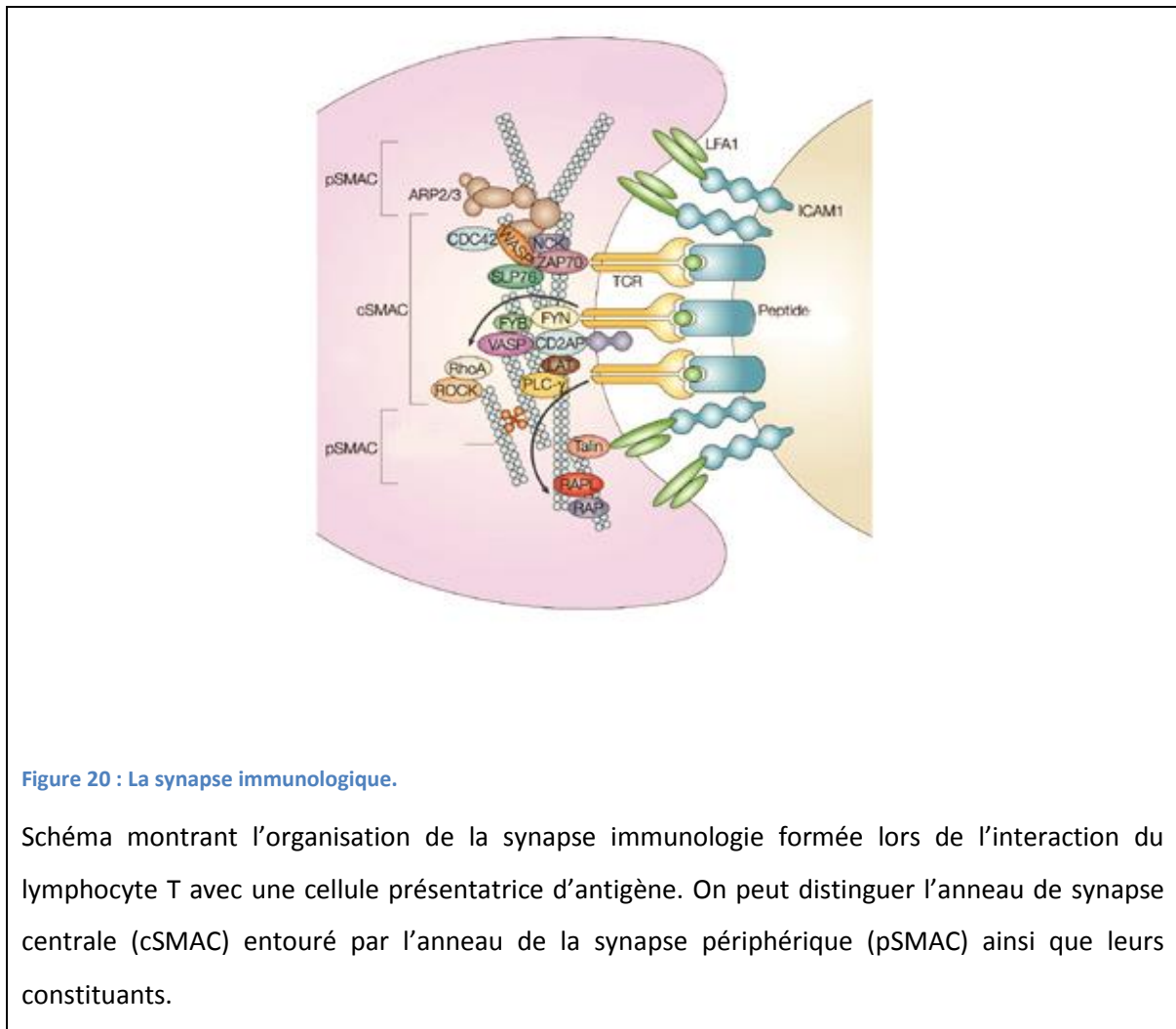


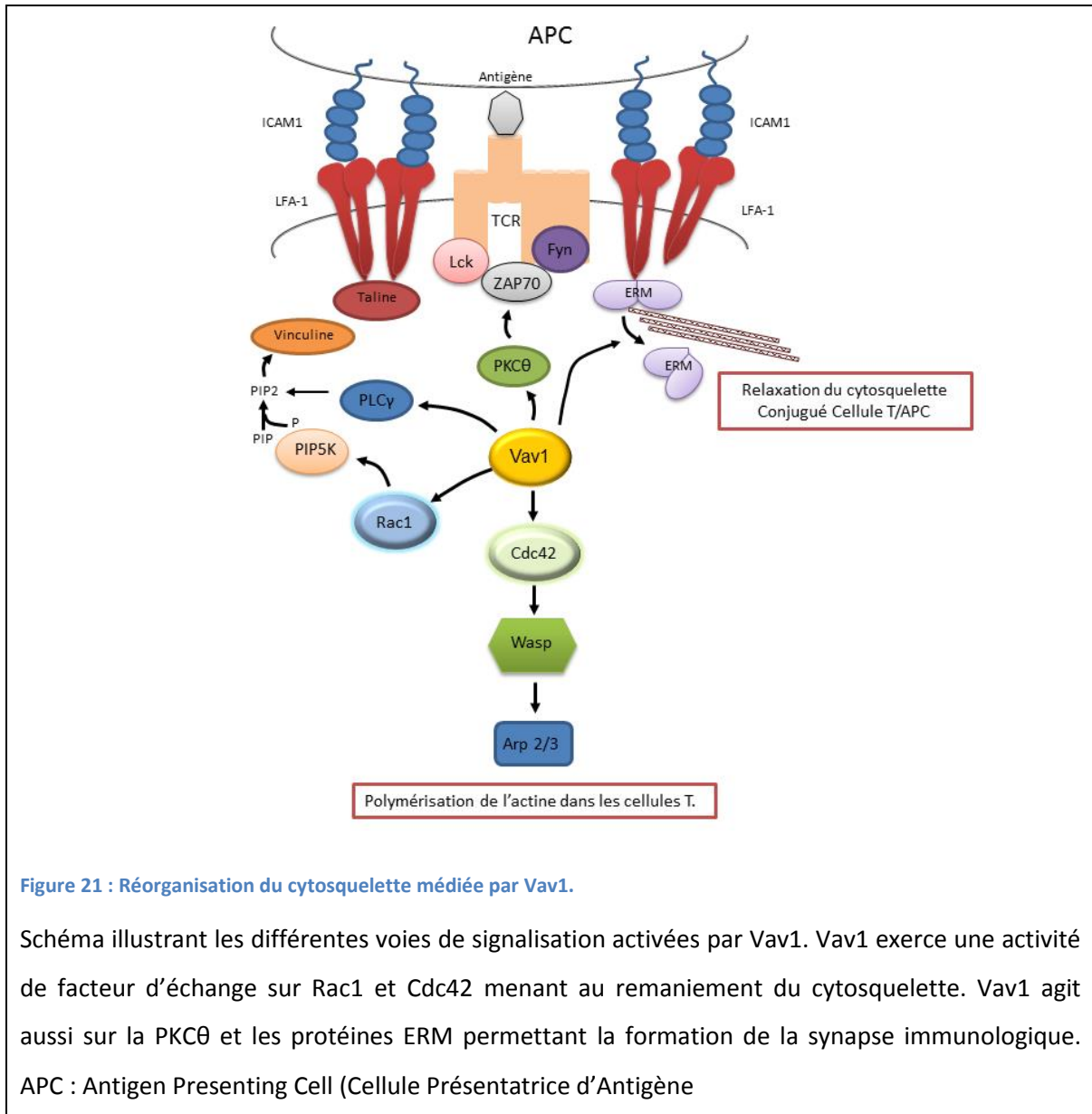
Figure 20 : La synapse immunologique.

Schéma montrant l'organisation de la synapse immunologie formée lors de l'interaction du lymphocyte T avec une cellule présentatrice d'antigène. On peut distinguer l'anneau de synapse centrale (cSMAC) entouré par l'anneau de la synapse périphérique (pSMAC) ainsi que leurs constituants.

Il a été mis en avant que Vav1 participait activement à la formation de la synapse immunologique et son organisation en ces deux zones. Des études effectuées sur des thymocytes doublement positifs (exprimant les marqueurs CD4⁺/CD8⁺) déficients en Vav1 ont démontré l'implication de Vav1 dans l'activation de l'intégrine LFA-1. En effet, ces thymocytes déficients en Vav1 présentaient un défaut de formation du conjugué « lymphocyte-CPA » comparé aux thymocytes sauvages contrôles. Par ailleurs, la ségrégation de la synapse en deux zones distinctes nécessite aussi un remodelage du cytosquelette d'actine. Vav1 participe à ce remodelage *via* différentes cibles intracellulaires. L'une des cibles de Vav1, Rac, permet la production du Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate ou PIP2 via l'activation de la kinase PIP5K. La présence des phospholipides PIP2 assure la croissance des filaments d'actine et leur polymérisation (106), **Figure 21**. Vav1 coopère également avec les adaptateurs SLP76 (SH2 domain-containing leukocyte protein of 76 kDa) et Nck (Non Catalytic region of tyrosine Kinase adaptor protein 1) pour activer Cdc42 et son effecteur WASP. Ces protéines recrutées au niveau de la synapse immunologique via le complexe

tri-moléculaire SLP76-Nck-Vav1, cible le complexe de nucléation de l'actine Arp2/3 (107, 108),

Figure 21.



La déformation de la cellule T lors de son association à l'APC nécessite une diminution de la rigidité cellulaire qui est dépendante des protéines Ezrin/Radixin/Myosin (ERM). En effet, la rigidité de la cellule est basée sur les liaisons transversales des protéines ERM, avec d'une part le cytosquelette d'actine et d'autre part la membrane plasmique. Il a été suggéré que la déphosphorylation des protéines ERM en réponse à l'activation de la cellule T met en jeu une voie Vav1/Rac aboutissant à l'inactivation des ERM et à l'assouplissement de la cellule (109), **Figure 21**. Le rôle de Vav1 dans la formation de la synapse immunologique implique ainsi, à la fois sa fonction de facteur d'échange et d'adaptateur (110-112).

6.1.2 Signalisation en réponse à la stimulation antigénique

L'activation optimale des lymphocytes T nécessite un premier signal intracellulaire enclenché par la liaison du peptide antigénique au TCR puis un deuxième signal généré par l'occupation, par son ligand le CD86, du corécepteur CD28 associé au TCR. La propagation de ces signaux est assurée par un complexe de signalisation ou « signalosome » qui se met en place autour du TCR/CD28 et dont la constitution est initiée par l'activation de la kinase ZAP70 (113). Parmi les composants du signalosome des lymphocytes T, il y a les protéines adaptatrices LAT et GADS. L'association constitutive de GADS avec la protéine SLP76 permet la participation de cette dernière au signalosome et sa phosphorylation. Puis Vav1 est recrutée à la membrane plasmique pour s'associer au complexe d'activation du TCR via SLP76 et est phosphorylée par ZAP70. Vav1 est la molécule de transduction la plus précoce activée en réponse à la stimulation antigénique. Vav1 mobilise au sein du signalosome divers partenaires qui vont coopérer avec elle dans l'intégration et la transduction des signaux émanant de la stimulation du TCR et du CD28 (114). Vav1 active ainsi diverses voies de signalisation telle la voie calcique et la voie des MAPK qui vont aboutir à l'activation de facteurs de transcription et à l'expression de gènes cibles, comme par exemple l'IL-2.

6.1.2.1 Régulation du flux calcique

Une étape cruciale lors de l'activation lymphocytaire en réponse aux antigènes est l'élévation de la concentration intracellulaire en calcium qui va déterminer l'intensité et la forme de la réponse immune. Un des partenaires de Vav1, important pour l'induction de flux calciques, est la « phospholipase C Gamma » PLC γ . Cette lipase est responsable de l'hydrolyse du PIP2 pour générer les seconds messagers : « inositol 1, 4, 5-trisphosphate » (IP3) et « diacylglycerol » (DAG). La liaison de l'IP3 à son récepteur présent à la surface du réticulum endoplasmique va permettre le relargage du calcium à partir des stocks et la régulation du calcium cytosolique. L'isoforme 1 de la PLC γ est exprimée préférentiellement dans les lymphocytes T et est recrutée au niveau du signalosome *via* l'adaptateur LAT. La PLC γ est phosphorylée et activée par la kinase Itk (un membre de la famille Tec) de manière Vav1 dépendante en réponse à la stimulation du TCR (78). La PLC γ possède trois sites de phosphorylation : les Tyrosine 771, 783, 1254 ; celle en position 783 a été identifiée comme étant le résidu régulateur important pour son activation.

Deux modèles de régulation de la PLC γ ont été proposés lors d'une étude basée sur l'utilisation de thymocytes doublement positifs (CD4⁺/CD8⁺) : d'une part, Vav1 activerait la PI3K via la GTPase Rac, ce qui permettrait l'activation d'Itk qui va alors phosphoryler la PLC γ au niveau

du résidu 783. D'autre part, Vav1 stabiliserait l'association de la PLC γ avec les adaptateurs SLP76 et GADS et sa participation au signalosome (115). Ce dernier modèle a pu être vérifié et étayé dans une étude récente faite sur la forme de Vav1 déléetée du domaine CH. Dans ce travail, il a été mis en évidence, par des techniques de microscopie, que la délétion du domaine CH altérerait l'interaction de Vav1 avec la PLC γ au sein du signalosome. Cette altération était accompagnée d'une diminution de la phosphorylation de la PLC γ au niveau de sa tyrosine régulatrice et d'une inhibition de la production d'IP3. La délétion du domaine CH affecte la conformation de Vav1 ainsi que sa position et son orientation par rapport à la PLC γ au sein du complexe associé au TCR (116).

6.1.2.2 Modulation des voies MAPK

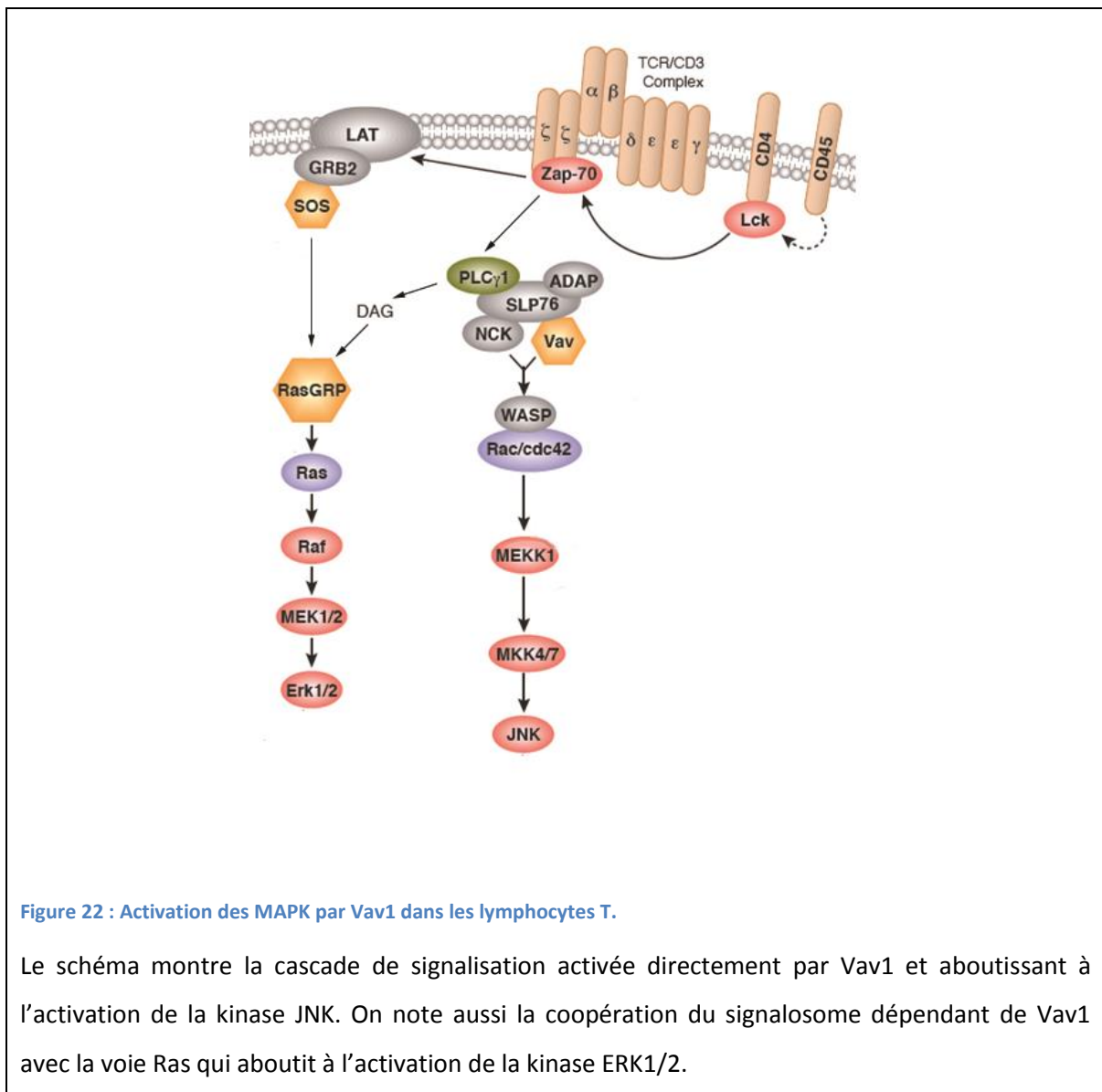
Plusieurs données de la littérature soulignent l'implication de Vav1 dans la cascade de signalisation des MAPK, notamment *via* l'activation de la kinase JNK. Les travaux d'Olson *et al* dans les cellules COS-1 ont mis en évidence que la co-expression de Vav1 et de JNK stimule *in-vitro* l'activité kinase de celle-ci sur le facteur de transcription c-jun. Ils suggèrent que cet effet de Vav1 sur JNK est dû à l'activation de Rac1 (49). Dans le modèle Jurkat, la stimulation du TCR et de son corécepteur CD28 entraîne une phosphorylation accrue et prolongée de Vav1. Cette phosphorylation aboutit à l'activation de la fonction d'échange de Vav1 sur Rac. Ceci déclenche une cascade de signalisation impliquant la MAP3K : MLK3, qui active la MAP2K : MKK7 qui phosphoryle et active à son tour la MAPK, JNK (114), **Figure 22**. Toutefois, une étude a souligné que Vav1 montre une faible capacité de stimulation de JNK dans les cellules Jurkat, comparée à ce qui est observée dans des cellules non hématopoïétiques. L'activation de JNK dans un contexte hématopoïétique nécessite au moins la stimulation des corécepteurs CD3/CD28, alors que la surexpression de Vav1 dans des fibroblastes COS7 et des cellules épithéliales 293T suffit à stimuler JNK (117). L'ensemble de ces résultats pointe vers une activation de JNK par Vav1 dépendante du contexte cellulaire.

L'activation des kinases de la famille ERK dans la plupart des types cellulaires, notamment les lymphocytes T, est attribuée à la fonction de la GTPase Ras. La stimulation et la catalyse de l'échange nucléotidique sur Ras lui permettent d'interagir avec son effecteur, la sérine thréonine kinase Raf qui va pouvoir activer la MAP2K, MEK (Mitogen-activated protein/extracellular signal-regulated kinase kinase), **Figure 22**. MEK, une fois activée, va pouvoir phosphoryler et activer la kinase ERK (Extracellular Regulated Kinase) qui cible alors plusieurs facteurs de transcription. Des expériences utilisant les thymocytes doublement positifs issus de souris sauvages ou déficientes pour Vav1 ont impliqué Vav1 dans la régulation de la voie Ras/ERK. La stimulation, via le CD3, de thymocytes issus de souris sauvages, contrairement aux thymocytes issus de souris *knockout* pour Vav1, montre une claire activation de Ras et une phosphorylation des protéines b-Raf, MEK et

ERK. Dans cette étude, il a été mis en évidence que Vav1 active aussi la voie Ras en favorisant à la fois le recrutement membranaire du facteur d'échange RasGRP1 et le recrutement au sein du signalosome du facteur d'échange Sos (118).

6.1.2.3 Activation de facteurs de transcription

Le rôle médié par Vav1 dans diverses voies de signalisation intracellulaire l'implique directement dans le mécanisme d'activation de plusieurs facteurs de transcription. En guise d'exemple, nous considérerons en premier lieu le facteur de transcription « Nuclear Factor of Activated T-cells » (NFAT).



Dans les cellules non stimulées, NFAT est une protéine cytoplasmique hyperphosphorylée. L'activation de NFAT nécessite la déphosphorylation de certains résidus Sérine, par la phosphatase calcineurine. L'activation de la calcineurine fait suite à la production de diacylglycérol et d'inositide 3 phosphate conduisant à la libération de calcium cytoplasmique et activant la protéine régulatrice calmoduline. Une fois déphosphorylée, la protéine NFAT peut migrer au noyau et initier l'activation transcriptionnelle de gènes cibles comme par exemple l'IL2, l'IL3 ou l'IL4 (119), **Figure 23**.

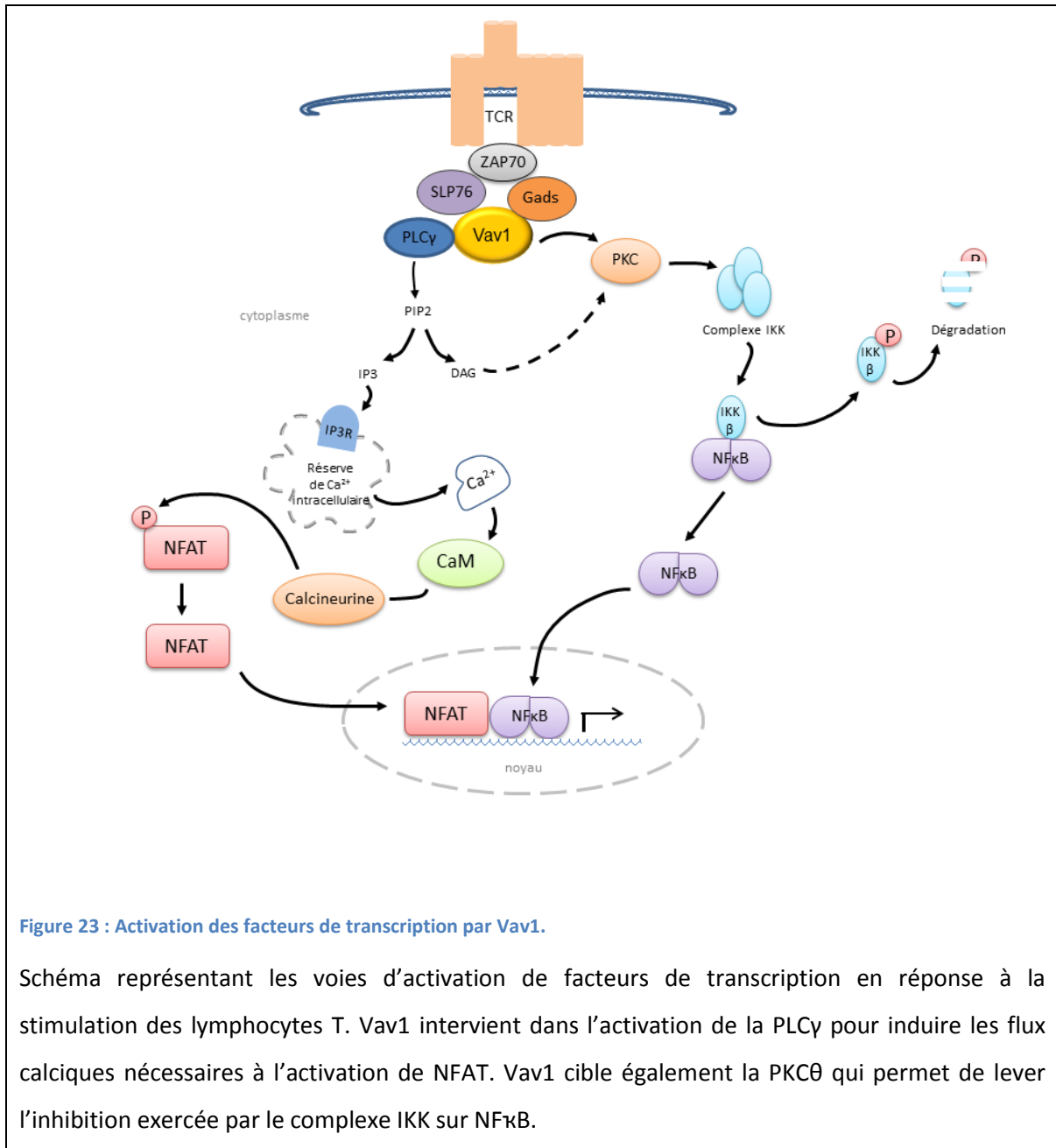


Figure 23 : Activation des facteurs de transcription par Vav1.

Schéma représentant les voies d'activation de facteurs de transcription en réponse à la stimulation des lymphocytes T. Vav1 intervient dans l'activation de la PLCγ pour induire les flux calciques nécessaires à l'activation de NFAT. Vav1 cible également la PKCθ qui permet de lever l'inhibition exercée par le complexe IKK sur NFκB.

La surexpression de Vav1 dans les cellules Jurkat est déjà suffisante à activer le facteur NFAT. Cette activation de NFAT est potentialisée par la stimulation du TCR et implique la phosphorylation des Tyrosine de Vav1. L'implication de cette dernière dans l'activation du facteur NFAT a été confirmée par l'utilisation d'un immunosuppresseur ciblant la calcineurine, le composé FK506 (120). Les travaux de l'équipe du Dr. Weiss, basés sur l'étude de mutants de Vav1, ont suggéré que la fonction de facteur d'échange n'est pas primordiale à l'activation de NFAT. En effet, Vav1 dépourvue des 67 acides aminés N-terminaux (et donc dotée d'une fonction GEF constitutive) reste incapable d'activer NFAT, même si cette forme tronquée peut activer de manière importante des cibles en aval de Rac, telle que JNK. De plus, un mutant de Vav1 présentant une mutation dans le domaine DH (inactivant la fonction GEF) est toujours capable de stimuler l'activation de NFAT (121). Ainsi, c'est la participation de Vav1 aux différentes voies de signalisation, dont l'induction du flux calcique, qui est à l'origine de l'activation de NFAT.

Les protéines NF κ B forment une autre famille de facteurs de transcription essentiels à la fonction lymphocytaire et à l'immunité adaptative. Ce sont des dimères de protéines pouvant lier l'ADN mais constitutivement associés à la protéine inhibitrice I κ B dans le cytoplasme. Lors de la stimulation des lymphocytes, les cascades de signalisation initiées convergent au niveau du complexe IKK (I κ B Kinase) responsable de la phosphorylation d'I κ B et de sa dégradation, indispensable à l'activation de NF κ B, par le complexe d'ubiquitination avec la ligase β -Trcp (122), **Figure 23**. Les travaux de Costello *et al* ont montré qu'en absence de Vav1, la stimulation des lymphocytes n'aboutit pas à la dégradation de la protéine I κ B. Ainsi, le facteur NF κ B reste séquestré et ceci, même après addition d'ionomycine (un ionophore permettant le relargage du calcium). L'ensemble de ces observations confirme un rôle spécifique de Vav1, indépendant de la voie calcique, dans l'activation de NF κ B. Par ailleurs, la surexpression de Vav1 dans des cellules Jurkat conduit à l'augmentation de manière dose-dépendante de l'activité transcriptionnelle de NF κ B. Il a été montré que la PKC θ coopère avec Vav1 pour potentialiser cette activité transcriptionnelle, en augmentant l'activité du complexe IKK et en favorisant la liaison à l'ADN du facteur NF κ B (123). D'autres travaux sur des cellules Jurkat déficientes en protéine SLP76 ont souligné l'importance de son association avec Vav1 dans l'activation de la PKC θ et de NF κ B. L'expression d'un mutant de SLP76 dépourvu des sites de liaison à Vav1 ne permet pas de rétablir l'activation de NF κ B en réponse à la stimulation lymphocytaire, contrairement à l'introduction de la forme sauvage de SLP76 (124). L'activation de NF κ B par Vav1 requiert son rôle de facteur d'échange ; ainsi, l'expression du mutant de Vav1, déficient pour la fonction GEF, ne restaure pas l'activation de NF κ B dans les cellules Jurkat dépourvues de Vav1 (125).

6.1.2.4 Expression génique : exemple du gène de l'IL2 impliqué dans la prolifération

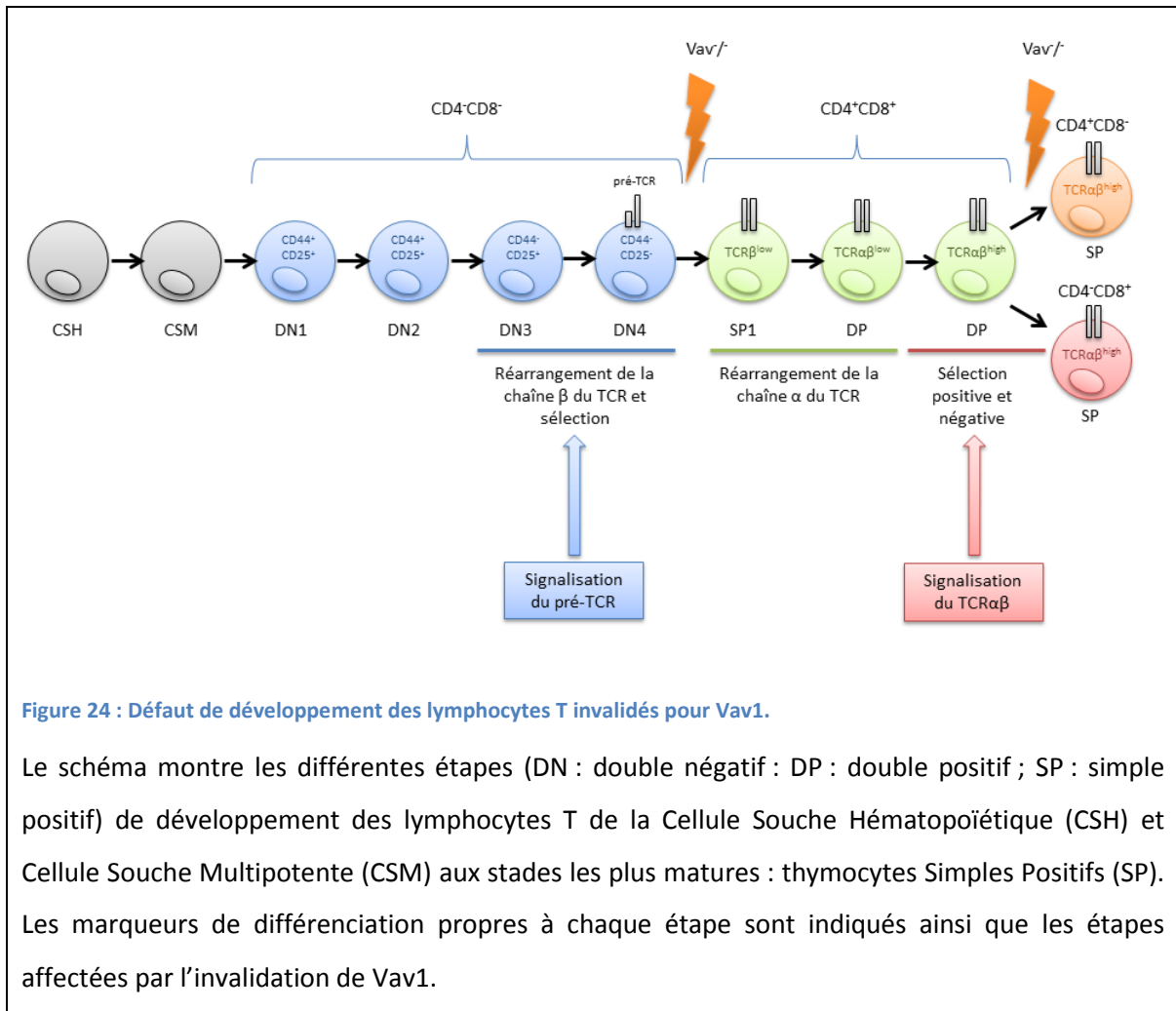
L'ensemble des voies de signalisation impliquant Vav1 convergent toutes vers l'activation de facteurs de transcription inducteurs de gènes cibles, nécessaires à la production de facteur de croissance, à la prolifération et à la survie cellulaire. Les facteurs de transcription peuvent coopérer pour activer un promoteur spécifique, c'est le cas de celui de l'IL-2 qui présente des sites de liaison pour :

- le facteur NFAT (dans sa région distal),
- le facteur AP1 (constitué du dimère c-jun, c-fos)
- l'élément de réponse au CD28 (CD28 Response element : CD28RE/AP).

Différentes études dans le modèle Jurkat ont mis en évidence que Vav1 active de manière significative la transcription dépendante du facteur AP1 et de l'élément CD28RE/AP situés sur le promoteur de l'IL2. Ceci implique l'activation de la voie JNK en réponse à la stimulation au CD3/CD28 (114, 126). L'équipe du Dr. Altman a analysé les contributions respectives des facteurs NFAT et AP1 dans l'activation du promoteur de l'IL2. Ainsi, la surexpression de Vav1 et la stimulation des cellules Jurkat induisent la liaison à l'ADN et l'activation transcriptionnelle des facteurs NFAT et AP1. Cette activation nécessite un couplage des deux facteurs pour leur fixation sur le promoteur distal de l'IL2. C'est une voie Rac1/JNK/c-jun/AP1 déclenchée par Vav1 qui joue un rôle prédominant dans l'activation transcriptionnelle du gène de l'IL2 (127).

6.2 Importance physiologique : les souris invalidées

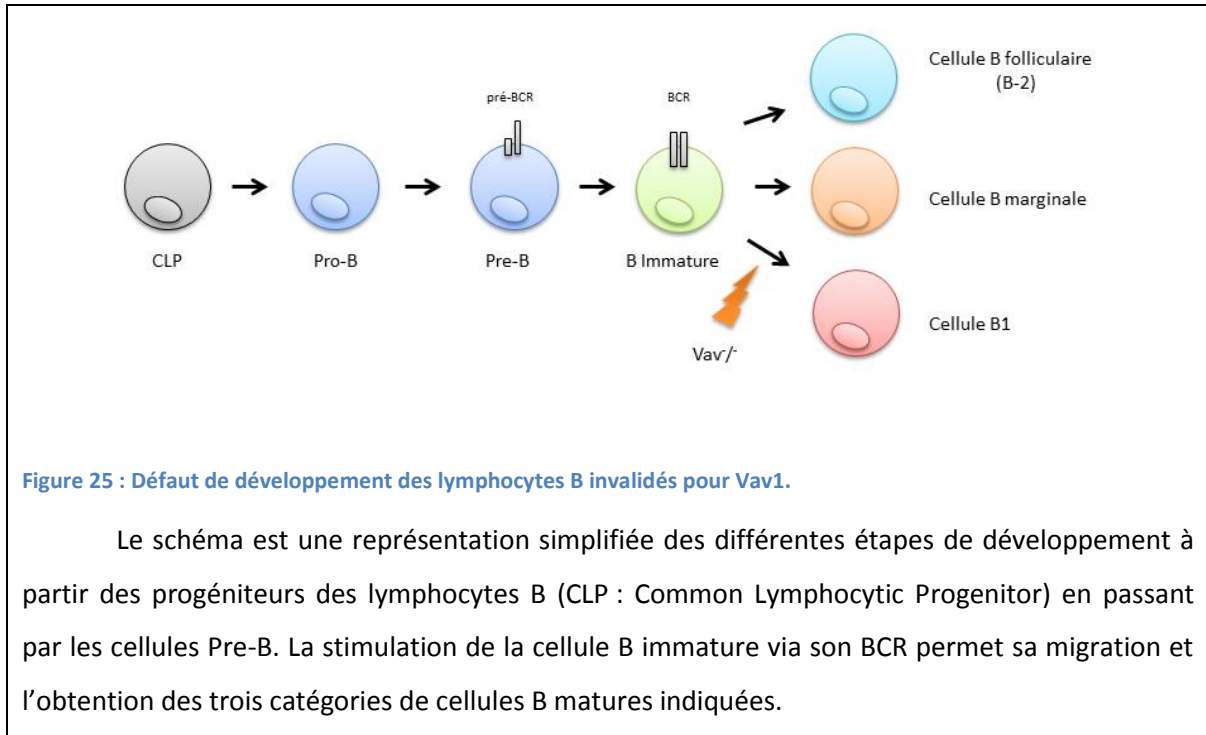
L'étude du phénotype des souris invalidées pour le gène codant Vav1 a permis de comprendre les mécanismes moléculaires à la base de ses fonctions physiologiques et de son rôle dans le développement des lymphocytes. Les lignages hématopoïétiques dérivent de précurseurs lymphoïdes ou myéloïdes issus de la différenciation progressive d'un progéniteur commun, la cellule souche hématopoïétique (CSH). Chaque stade de différenciation est caractérisé par l'expression de marqueurs membranaires spécifiques (par exemple CD4, CD8) qui permettent de les distinguer. Les progéniteurs CD4⁻/CD8⁻ double négatif (DN) après réarrangement de la chaîne β du TCR présentent à leur surface un récepteur pré TCR fonctionnel. Les signaux émanant du pré TCR permettent aux cellules DN de se différencier en cellules CD4⁺/CD8⁺ double positives (DP). Après réarrangement de la chaîne α , les signaux provenant du TCR permettent la sélection en simple positif (SP) des cellules CD4⁺ ou CD8⁺ (34, 128), **Figure 24**.



Les souris invalidées pour *vav1* sont viables et grandissent normalement. Les défauts constatés chez les souris *Vav1*^{-/-} concernent de manière prépondérante le développement et les fonctions effectrices des lymphocytes T. L'absence de Vav1 résulte en un blocage de la transition des thymocytes du stade double négatif (CD4⁻/CD8⁻) vers le stade double positif (CD4⁺/CD8⁺) et en un défaut de sélection positive et négative des thymocytes (129, 130), **Figure 24**. Ces caractéristiques reflètent une incapacité des cellules à transmettre les signaux émanant du pré-TCR, ainsi les souris *Vav1*^{-/-} présentent une lymphopénie au stage postnatal. La population résiduelle de lymphocytes T matures a, quant à elle, un défaut de réponse et de prolifération après engagement du TCR dû à un défaut de polymérisation de l'actine, de conjugaison aux cellules présentatrices d'antigène et de production de cytokines (131-133).

Dans le cas des lymphocytes B, les défauts constatés sont moins sévères et semblent dépendre du type de lignage B. Les cellules B conventionnelles se développent normalement et il n'y a pas réduction de la population de cellules B immatures de la moelle épinière (134). Toutefois, l'expression de Vav1 est requise pour la maturation des cellules de type B1, une sous

population de cellules B localisée au niveau du péritoine (132, 135), **Figure 25**. Les lymphocytes B, dépourvus de Vav1, sont alors incapables de répondre à la stimulation par le BCR et son corécepteur, le CD19 et présentent un défaut de prolifération. L'absence de Vav1 perturbe également l'adhésion, l'étalement et la formation de la synapse immunologique, en réponse à l'engagement du BCR (136).



Les défauts entraînés par l'absence de Vav1 sont majoritairement observés dans des compartiments lymphocytaires et dans la signalisation des cellules mastocytaires, en réponse au récepteur de haute affinité pour les IgE, dont la composition protéique s'apparente à celle des récepteurs à l'antigène. Les autres lignages hématopoïétiques ne présentent pas d'anomalie majeure de leur fonction ou de leur développement. Le rôle primordial de Vav1 dans les lymphocytes T n'est compensé que partiellement par les autres membres de la famille Vav2 et Vav3. L'inactivation du gène codant pour Vav2 ou Vav3 n'induit pas d'anomalie significative dans le développement et l'activation des cellules T. Alors que l'inactivation combinée des gènes *vav1*, *vav2* et *vav3* ne fait qu'accentuer, dans les lymphocytes T, les phénotypes déjà observés lors de l'inactivation de *vav1*, dans les lymphocytes B, l'élimination combinée des 3 gènes *vav* conduit à un blocage sévère du développement des cellules pré-B (137).

7 Relevance pathologique de Vav1

Nous avons décrit dans les paragraphes précédents, les fonctions physiologiques attribuées à Vav1 dans les lignages hématopoïétiques. Nous aborderons dans cette partie,

l'implication possible de Vav1 et des signalisations qui lui sont associées, dans les pathologies ou anomalie du système hématopoïétique.

7.1 Implication dans les hémopathies : les modèles murins

Plusieurs études ayant utilisé le modèle d'inactivation du gène *vav1* chez la souris ont suggéré un rôle possible de Vav1 dans le développement d'hémopathies. Cette implication a aussi été mentionnée lors de l'analyse de l'inactivation de gènes codant pour les GTPases Rac, Ras ou d'autres facteurs d'échange.

Ainsi, l'inactivation du gène codant le facteur d'échange *Rasgrf2* en combinaison avec la délétion de *vav1*, entraîne à court terme, des défauts de développement et d'activation lymphocytaire. A long terme, la délétion combinée des gènes *vav1* et *rasgrf2* contribue de manière synergique au développement de lymphome T très agressif. La délétion seule de *vav1* chez la souris âgée favorise la formation de tumeurs de type lymphoblastique, localisées dans le thymus mais qui peuvent se disséminer dans les autres tissus. La délétion combinée de *vav1* et de *rasgrf2* augmente l'incidence de ces tumeurs et favorise leur dissémination en dehors du thymus, ce qui résulte en un accroissement du taux de mortalité des souris (138).

Dans leur étude, C. Dumont et coll., ont observé que les souris déficientes en *rac* présentent les mêmes phénotypes que les souris invalidées pour *vav1*, *vav2*, *vav3*, à savoir un blocage du développement des lymphocytes T et un défaut de sélection positive. De plus, les thymocytes n'exprimant pas de TCR β présentent une survie aberrante et une augmentation des gènes cibles de la voie Notch. Ces chercheurs ont ainsi suggéré l'existence d'une régulation de la voie Notch par une signalisation dépendante de Vav et de Rac. Les mutations gain de fonction de Notch étant souvent associées au développement de lymphome T chez la souris et l'homme, l'altération de la voie Vav/Rac contribuerait donc à l'apparition de lymphome via une dérégulation de la voie Notch (139, 140). Les travaux de criblage de Berquam-Vrieze *et al* sur des souris où des lymphomes à différents stades de développement des lymphocytes T sont induits, ont confirmé cette hypothèse. Les cellules souches hématopoïétiques portant une délétion conditionnelle de *vav* et ayant acquis un caractère leucémique, présentent en majorité des mutations du gène *Notch1*. *A contrario*, lorsque la leucémie est induite à un stade plus tardif de développement ou en utilisant le transgène *Ick*, les mutations sur *Notch1* ne sont plus détectées (141).

En utilisant toujours une approche sur les souris *vav1*^{-/-}, K. Chen *et al* a montré également un rôle de Vav1 dans l'apparition de thrombose et d'artériosclérose liée à une hyperlipidémie. Ces chercheurs ont montré que l'hyperréactivité plaquettaire aux lipoprotéines oxydées passe par un mécanisme de phosphorylation de Vav1 par la kinase Fyn. L'inactivation de *vav1* associée ou non

à *vav3*, de même que celle de *fyn* évite l'hyper réactivité des plaquettes à la fois *in vitro* et *in vivo* et empêche le développement de thrombose occlusive, même si l'animal est soumis à un régime riche en lipides (142).

Enfin, une étude récente de l'équipe de M.Villalba a impliquée Vav1 dans la génération de leucémie en infectant après naissance des souris déficientes pour Vav1 avec le virus murin de Moloney (M-MuLV : Moloney strain of murine leukemia virus). L'absence de Vav1 n'affecte pas l'incidence ou la latence de la tumeur développée en réponse à l'infection par le rétrovirus. Par contre les thymocytes issus de souris *Vav^{-/-}* deviennent leucémiques à un stade plus précoce de leur développement par rapport aux thymocytes issus de souris normales. Vav1 module donc le phénotype des cellules leucémiques retrouvées dans le thymus et en périphérie. Ce sont majoritairement des thymocytes doublement négatifs (au stade DN4 : *CD44⁻/CD25⁻*, en page 57). Ceci démontre l'importance de Vav1 et du stade de développement des lymphocytes T dans la genèse de cellules leucémiques (143).

7.2 Anomalies dans le système hématopoïétique

L'ensemble des données des études *in-vivo* pointent vers un rôle de Vav1 dans le développement de certaines hémopathies malignes. La première pathologie humaine pour laquelle une dérégulation de Vav1 a été décrite est la leucémie lymphoïde chronique des cellules B (LLC). L'étude d'une cohorte de patients non sélectionnés atteints de diverses hémopathies, a démontré la surexpression et la phosphorylation de Vav1 chez les patients atteints de LLC et présentant une délétion du chromosome 13q. Dans les autres hémopathies analysées, notamment les syndromes myéoloprolifératifs, le niveau d'expression de Vav1 reste inaltéré (144).

Vav1 aurait aussi un rôle important dans l'évolution des lymphomes B diffus à larges cellules, une pathologie maligne caractérisée par une grande variabilité de réponses aux thérapies. Il existe une corrélation entre le niveau d'expression de Vav1 et la réponse au traitement par le CD40 ligand de ces cellules. Le CD40 ligand, exprimé à la surface des lymphocytes T activés, interagit avec son récepteur, le CD40 présent à la membrane des lymphocytes B dont il régule les fonctions. Les cellules résistantes à la thérapie basée sur le CD40 ligand n'expriment pas d'ARNm de Vav1 et présentent une augmentation des marqueurs de surface caractéristiques des lymphocytes B immatures. Cette résistance résulte non seulement de l'absence de Vav1 mais aussi d'une incapacité à activer le facteur NFκB. Le profil d'expression de Vav1 pourrait ainsi servir de marqueur permettant l'identification des lymphomes B diffus à large cellule pouvant être traités par le ligand CD40 (145).

Des données de la littérature montrent que Vav1 peut ainsi être une cible intéressante dans certains traitements. A titre d'exemple, dans la leucémie promyélocytaire aigüe (APL : Acute Promyelocytic leukemia), plusieurs études ont montré que Vav1 était l'une des cibles régulées par l'acide transrétinoïque (ATRA : *all-trans* retinoic acid). Ce composé, malgré de nombreuses études cliniques avec d'autres molécules (exemple : anticorps monoclonal anti-CD33, anthracycline), reste le traitement principal pour les patients atteints d'APL. Le traitement par l'ATRA induit la différenciation des cellules tumorales en neutrophiles et grâce à un réseau complexe de signalisation, aboutit à l'apoptose de ces cellules (146). L'équipe de S. Capitani a montré que Vav1 était essentiel à la différenciation des cellules promyélocytaïres dérivées d'APL. En effet, Vav1 peut moduler le niveau d'expression de protéines ciblées par l'ATRA, via une participation à des complexes transcriptionnels et sa phosphorylation sur la Tyrosine 745 est nécessaire à l'achèvement du programme de différenciation par l'ATRA. Néanmoins, il n'existe pas d'évidence directe d'une activité suppresseur de tumeur de Vav1 dans l'APL, puisque sa répression ne conduit pas au développement d'APL dans les souris *vav1*^{-/-} (147-149).

En 2009, Jagodic *et al*, ont identifié un polymorphisme de type « single nucleotide polymorphisms » (SNPs) du gène *vav1* associé à l'apparition d'une inflammation chronique du système nerveux à l'origine de la sclérose multiple. Cette étude démontre un lien entre l'haplotype de Vav1 et la susceptibilité à la sclérose multiple. L'analyse d'une cohorte de patients atteints de cette dégénérescence nerveuse, a montré que l'expression de Vav1 est significativement élevée chez ces patients. Cette forte expression est corrélée à une augmentation du TNF et de l'IFN γ présents dans le sang périphérique. Ceci souligne un rôle critique de Vav1 dans le développement de pathologies immunes au niveau du système nerveux central, via la modulation de la production de cytokines pro-inflammatoires (150).

Vav1 est donc une cible pharmacologique attractive, notamment dans le traitement d'hémopathies malignes, mais des études supplémentaires seront nécessaires afin de mieux caractériser les pathologies humaines mettant en jeu une dérégulation de Vav1 et pouvant être ciblées.

Nous avons décrit jusqu'à présent, à la fois la relevance physiologique de Vav1 avec son rôle essentiel dans le maintien de l'homéostasie du système hématopoïétique et son implication possible en pathologie. L'homéostasie peut être rompue par une dérégulation de la fonction GEF de Vav1, comme c'est le cas pour de nombreux facteurs d'échange ; elle aboutit à une activation oncogénique des protéines. Cette activité transformante peut aussi ne pas résulter d'une dérégulation fonctionnelle de la protéine mais plutôt de son expression aberrante. Nous aborderons ces différents aspects dans ce troisième et dernier volet consacré à la description des capacités oncogéniques de Vav1.

1 Caractérisation de formes oncogéniques de Vav1

Plusieurs oncogènes chez les vertébrés, dont l'Homme, ont été identifiés par des techniques visant à caractériser une activation transformante *in-vitro*. Cette approche a permis d'isoler de nouveaux gènes grâce à leur capacité à induire ou non la transformation cellulaire et a démontré leur importance dans les voies de signalisation. Ce fut par exemple le cas de la famille *ras*, de certaines tyrosines kinases (telles *src* ou *abl*) ou de facteurs de transcription (*fos* ou *erbA*) et ce fut également le cas pour *vav1*.

1.1 Mise en évidence de formes oncogéniques de Vav1

Vav1 a été découvert en 1989, au cours d'une expérience de criblage de gènes à capacité transformante dans les fibroblastes NIH3T3, par le Dr. Shulamit Katzav. Au cours de l'expérience de clonage, la séquence 5' codante de la protéine a été remplacée par une séquence issue du plasmide pSV2neo utilisé comme marqueur de sélection. L'analyse moléculaire de l'ADN cloné a permis d'identifier une protéine tronquée de 79kDa avec une capacité oncogénique, **Figure 26**. Cette capacité se traduit par la formation de foyers de cellules transformées dans les fibroblastes qui, après injection dans la souris *nude*, induisent la formation de tumeurs. Ce gène étant le sixième identifié au cours de l'expérience de criblage, il fut désigné selon la sixième lettre de l'alphabet hébreu « *vav* ». La séquence codant pour le proto-oncogène entier fut isolée deux ans plus tard par la même équipe, à partir d'une banque d'ADN complémentaires murins dérivés de lignées de cellules hématopoïétiques (WEHI-3B, EL-4). La protéine complète de 95kDa présente une région amino-terminale riche en leucine, absente dans la forme oncogénique (que nous nommerons onco-Vav dans le reste de ce manuscrit) (35).

Au cours de ces premiers travaux sur la forme tronquée oncogénique, l'équipe du Dr. Barbacid avait noté que la délétion de la région riche en leucine suffisait à activer le potentiel oncogénique, **Figure 26**. Plus tard, l'équipe du Dr. Katzav a démontré que l'expression du proto-oncogène Vav1 entier dans les NIH3T3 pouvait aussi induire la transformation, mais de manière beaucoup plus faible que celle induite par onco-Vav **Figure 26**. Ceci leur a permis d'émettre l'hypothèse que c'est la perte de l'extrémité 5' du proto-oncogène et non son expression ectopique dans les fibroblastes, qui active le potentiel oncogénique (151).

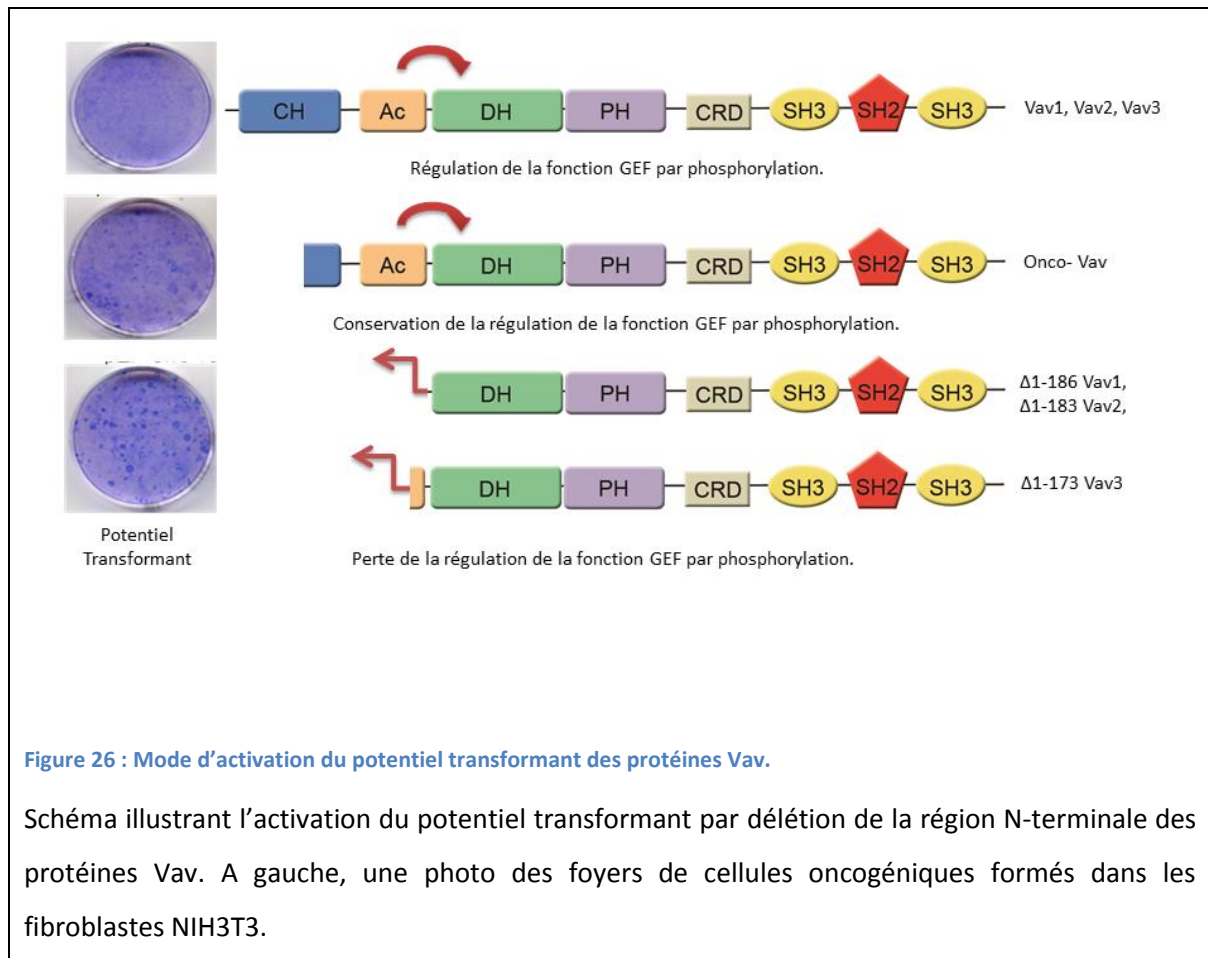


Figure 26 : Mode d'activation du potentiel transformant des protéines Vav.

Schéma illustrant l'activation du potentiel transformant par délétion de la région N-terminale des protéines Vav. A gauche, une photo des foyers de cellules oncogéniques formés dans les fibroblastes NIH3T3.

Plusieurs analyses ont démontré l'implication de séquences additionnelles à la région N-terminale de Vav1 dans la capacité transformante. Des mutants de Vav1, dépourvus respectivement des 127, 168 ou 186 premiers acides aminés de la région amino-terminale, ont été analysés pour leur capacité à transformer les fibroblastes. Le nombre de foyers de cellules transformées, induits par les mutants, augmente de manière proportionnelle à la taille de la délétion. Ainsi, les mutants dépourvus des 168 et 186 acides aminés et donc privés à la fois du domaine CH et Ac, présentent la plus forte activité transformante, **Figure 26**. La région Ac

renferme les Tyrosine régulatrices de Vav1 et l'élimination de cette région engendre une protéine constitutivement active qui ne peut plus être régulée par phosphorylation (152) (en page 45).

1.2 Mise en évidence de formes oncogéniques de Vav2 et Vav3

Après isolement et caractérisation de l'ADN complémentaire codant Vav2 chez la souris, son potentiel transformant dans les NIH3T3 a également été évalué en supprimant certaines séquences d'acides aminés dans sa région N-terminale. Dans ce cas, l'élimination des 183 résidus N-terminaux (qui correspondent à la région CH et Ac) est nécessaire pour activer le potentiel oncogénique de Vav2 (39).

L. Zeng *et al*, en caractérisant des partenaires protéiques du récepteur à activité tyrosine kinase Ros (RTKR : Ros receptor protein tyrosine kinase), a isolé en utilisant la technique du double hybride chez la levure, la protéine Vav3. A l'instar de Vav1, la délétion de la région CH active le potentiel transformant de la protéine. De même, la délétion combinée des régions CH et Ac de Vav3 est requise pour obtenir une activité transformante maximale (153).

Les protéines Vav partagent donc un mécanisme commun d'activation de leur potentiel oncogénique par délétion de leur domaine amino terminal, **Figure 26**.

1.3 Régulation de la capacité transformante

1.3.1 Rôle de l'extrémité amino-terminale

L'activation du potentiel transformant de Vav1 par délétion des 66 premiers acides aminés situés au niveau de la région CH N-terminale a été largement confirmée. En outre, cette suppression associée à celle d'une partie ou de la totalité de la région Ac semble accroître la capacité transformante de l'oncogène **Figure 26**. L'ensemble de ces observations a mené à la conclusion que les domaines CH et Ac exercent un rôle régulateur négatif sur l'activité transformante de Vav1. Cette conclusion est confirmée par les études biochimiques et structurales décrites dans le chapitre précédent et qui ont démontrée l'existence d'une boucle auto inhibitrice constituée par l'interaction des Tyrosine de la région Ac avec le domaine DH. Il est donc clair que dans l'oncogène, la suppression du domaine CH abolit la formation de cette boucle inhibitrice, ce qui conduit à une conformation active « ouverte » constitutive de la protéine. Toutefois la présence de la région Ac dans onco-Vav lui permet encore d'être régulé par phosphorylation (152).

1.3.2 Rôle des domaines SH

La contribution des autres domaines de Vav1 à la régulation de l'activité transformant a été évaluée par des approches de délétions ou de mutations de certains résidus consensus. Dans

le cas des domaines SH, par exemple, les travaux de S. Katzav ont souligné l'importance de l'intégrité du domaine SH2 dans la transformation induit par onco-Vav. La mutation des résidus non conservés parmi les domaines SH2 connus, comme les arginines en position 629 et 647 (R629G ; R647L), n'affecte pas le potentiel transformant d'onco-Vav dans les fibroblastes, **Figure 27**. A l'inverse, la substitution des résidus consensus en position 622 et 642, (W622R ; G642V) réduit de manière significative la transformation. En revanche, ces substitutions ne sont pas capables d'activer le potentiel transformant du proto-oncogène (154), **Figure 27**.

De manière analogue au domaine SH2, des mutations introduites dans le domaine CSH3 d'onco-Vav et qui touchent des résidus conservés parmi les domaines SH3 connus, abolissent sa capacité transformante. Au contraire les mutations affectant des résidus non conservés de ce domaine n'influencent pas sur le potentiel de l'oncogène (155), **Figure 27**. L'approche par mutation ponctuelle indique un rôle régulateur des domaines SH de Vav1 sur son activité transformante. Pourtant, la délétion entière de ces domaines n'active pas la capacité transformante de Vav1, suggérant ainsi qu'ils ne sont pas strictement nécessaires pour la transformation (155). L'équipe de C. Der a clarifié ces résultats contradictoires en utilisant dans ses expériences, la forme la plus hautement oncogénique de Vav1 dépourvus de 186 acides aminés (Δ N-186 Vav). Ces expériences confirment que les domaines Src ont un rôle régulateur de la capacité transformante. La délétion de la totalité des domaines SH3-SH2-SH3 augmente de manière significative le potentiel de l'oncogène Δ N-186 Vav (156), **Figure 27**.

1.3.3 Contribution des domaines PH/CRD

En plus de la contribution des domaines SH, C. Der et ses collègues ont aussi relevé que le domaine CRD joue un rôle essentiel dans la capacité transformante. En effet, le mutant Δ N-186 Vav délété du domaine CRD (Δ N-186 Vav Δ CRD) n'est plus capable d'induire la formation de foyers. Ce domaine semble jouer un rôle important dans la médiation des signalisations à la base de l'activité transformante. Des mutations introduites dans le domaine PH de Δ N-186Vav réduisent également de manière importante la transformation, **Figure 27**. L'impact des domaines CRD et PH a cependant été évalué dans un contexte Δ N-186Vav combiné à une suppression du domaine SH3-SH2-SH3 (Δ N-186Vav- Δ C), afin d'éviter les interférences pouvant venir des interactions avec d'autres domaines. Ces résultats ont suggéré que des mutations ponctuelles introduites dans le domaine C-SH3 influeraient de manière indirecte, via les domaines adjacents, sur l'activité d'onco-Vav (155). Ainsi, la cassette DH/PH/CRD constituerait la région fonctionnelle minimale nécessaire à la transformation par l'oncogène Vav1 (156).

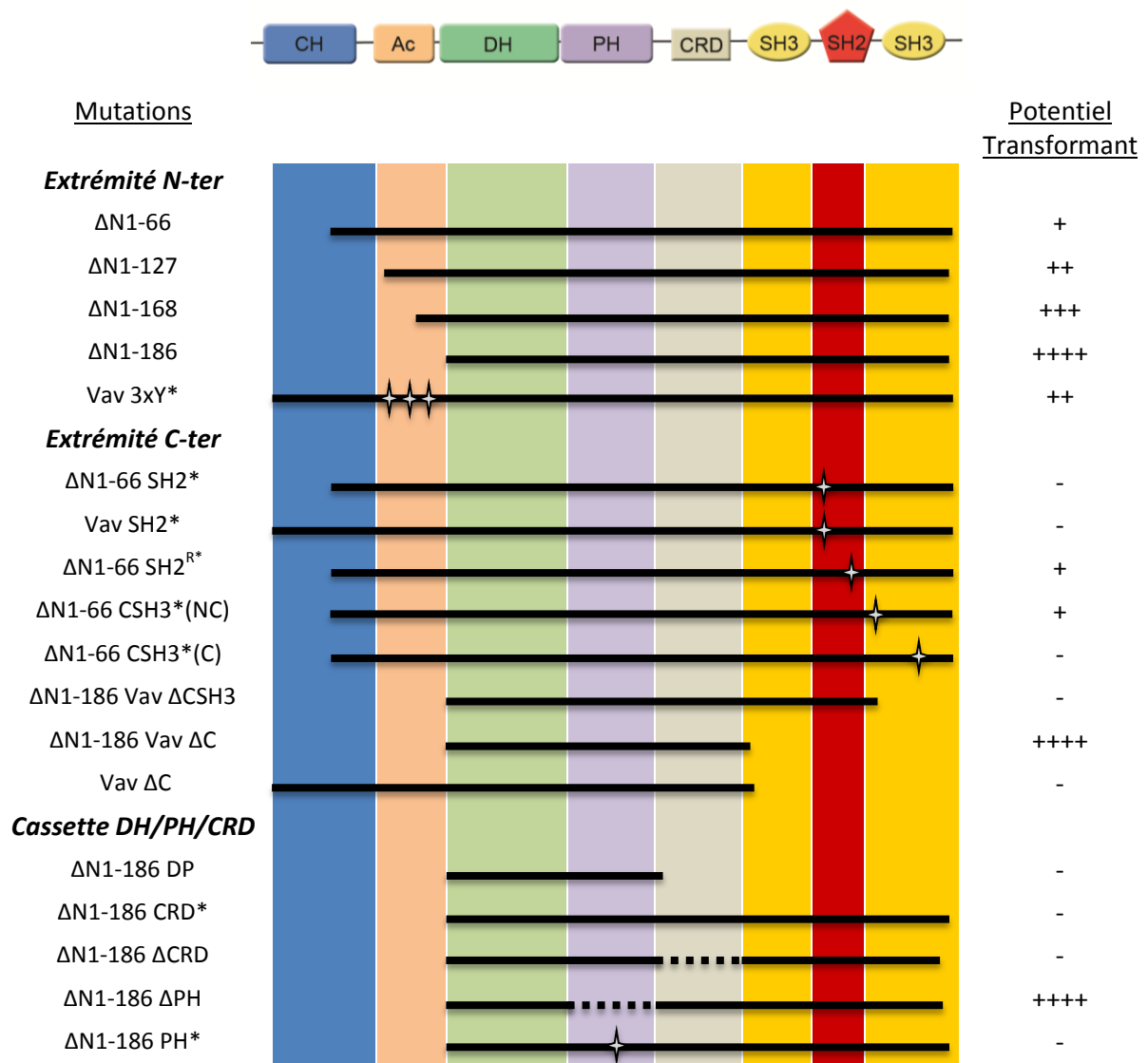


Figure 27 : Contribution des différents domaines au pouvoir transformant de Vav1.

Représentation des différents mutants cités dans le manuscrit et leur potentiel transformant dans les fibroblastes NIH3T3. Les mutations sur des résidus ponctuels sont notées par * et représentées par ✦. NC : résidus non conservés parmi les domaines SH3 ; C : résidus conservés.

2 Rôle émergent des protéines Vav dans le cancer

Du fait des propriétés oncogéniques caractérisés *in-vitro* des protéines Vav et de leur rôle clé au carrefour des voies de signalisation intracellulaire, plusieurs études s'intéressent à présent à l'implication directe des protéines dans les cancers humains. En particulier, de nombreux

travaux, tenant compte de l'expression tissulaire des deux protéines, portent sur l'étude du rôle de Vav2 et Vav3 dans les cancers.

2.1 Vav2 et cancer

2.1.1 *Expression de Vav2 dans les mélanomes*

Une étude a été réalisée par Ruben A. Bartolomé et ses collègues sur des lignées de mélanomes humains (BLM, Mel 57, MeWo) ainsi que sur des échantillons de tissus provenant de patients atteints de mélanome. Ils ont mis en évidence dans ces cellules, une faible expression de Vav2, mais également de Vav1. L'analyse par immunohistochimie des tissus tumoraux confirme l'expression de Vav1 et de Vav2 au niveau juxtamembranaire. Dans ces cellules, les protéines Vav sont phosphorylées en réponse à la stimulation des cellules par la chimiokine CXCL12 et interagissent avec les GTPases Rac et Rho. L'utilisation d'ARN interférents dirigés contre Vav1 et Vav2 bloque l'expression de la MT1-MMP (Membran type I matrix metaloproteinase) induite par CXCL12. L'augmentation de la MT1-MMP, en réponse à la fixation du CXCL12 sur son récepteur CXCR4, est un mécanisme courant qui permet aux cellules tumorales de s'évader au travers de la barrière basale. Ainsi, les protéines Vav participent à la régulation de l'expression de la métalloprotéinase MT1-MMP et sont impliquées dans l'invasion des cellules tumorales. L'ensemble de ces travaux a donc souligné l'importance de la coordination de la voie de signalisation dépendante de Vav et des GTPases Rho par CXCL12 dans le processus invasif des cellules de mélanomes (157).

2.1.2 *Expression dans les carcinomes*

Plusieurs études soulignent un rôle critique de Vav2 dans l'acquisition du phénotype invasif par les cellules cancéreuses. En effet, certaines lignées de carcinomes épidermoïdes HNSCC (Head and Neck Squamous Cell Carcinoma), présentent une phosphorylation persistante de Vav2, associée à une expression élevée de la forme active de Rac1 (Rac1 GTP). Cette activation de Rac1 résulte de l'activation par l'EGFR de Vav2. L'utilisation d'un inhibiteur pharmacologique de l'EGFR ou de siRNA, dirigé contre Vav2, a confirmé l'importance de cette voie EGFR/Vav2/Rac1 dans la motilité et la capacité d'invasion des cellules de carcinomes (158). Cette corrélation est retrouvée dans d'autres lignées de cancer buccal tel le « OSCC : oral squamous cell carcinoma », le niveau de Rac1 GTP étant plus élevé dans une lignée invasive que dans une lignée non invasive. L'étude démontre que cette activation importante de Rac1 dans ces cellules, est spécifique à l'expression de Vav2 et non du facteur d'échange Tiam1. L'expression de la forme tronquée oncogénique de Vav2 (onco-Vav2) dans les lignées invasives ou non, entraîne une forte activation

des GTPases Rac1 et Cdc42 et accentue leur capacité d'invasion *in-vitro*. Ce travail confirme le rôle critique, déjà démontré, de Vav2 dans l'invasion tumorale, *via* son activité sur les GTPases (159).

2.2 Vav3 et cancer

Divers travaux, dont ceux de Z. Dong et coll. ont démontré la relevance de la protéine Vav3 dans le cancer de la prostate. En effet une surexpression de Vav3 est observée dans des lignées de cancer de la prostate dont la croissance est indépendante des androgènes par rapport à des lignées dépendantes de ce facteur. Cette surexpression est retrouvée dans des tissus tumoraux issus de patients. D'un point de vue mécanistique, la surexpression de Vav3 stimule l'activité du récepteur aux androgènes (AR : androgen receptor) et déclenche une voie de signalisation PI3K-AKT qui activent les promoteurs des gènes cibles de l'AR. La voie de signalisation PI3K-AKT a été déjà décrite comme étant essentielle au développement et à la progression de cancer de la prostate (160).

Une étude plus récente sur des souris génétiquement modifiées exprimant une forme constitutivement active de Vav3 a confirmé *in-vivo* son rôle critique dans la progression tumorale. La surexpression de cette forme active de Vav3 dans l'épithélium de prostate de souris, induit le développement d'un néoplasme intra-épithéliale (161). Des travaux additionnels ont montré que Vav3 joue à la fois un rôle cytoplasmique au niveau des complexes d'activation autour de l'AR, mais également un rôle nucléaire dans les complexes d'activation cibles de l'AR. Le domaine PH de Vav3 est essentiel à la stimulation de l'activité de l'AR, mais Vav3 est également recruté au niveau de complexes nucléaires d'activation associé à l'AR (162).

De manière analogue, les analyses immunohistochimiques et biochimiques de tissus de cancer du sein et de lignées humaines, ont révélé une surexpression de Vav3 dans 80% des cellules étudiées. Dans ces lignées tumorales, Vav3 stimule la croissance des cellules et sa surexpression induit une hypersensibilité du récepteur à l'œstrogène (ER α : Eostrogen Receptor) qui se traduit par une augmentation de son activité transcriptionnelle. De manière intéressante, il a été mis en évidence *in vitro* que Vav3 était capable d'interagir avec l'ER α (163).

2.3 Rôle de Vav2 et Vav3 dans la tumorigenèse et le processus métastatique

2.3.1 Néoangiogenèse tumorale

Le développement de tumeur nécessite la formation de nouveaux vaisseaux sanguins à partir de vaisseaux préexistants : c'est la néoangiogenèse tumorale. Quelques travaux ont décrit un rôle des protéines Vav2 et Vav3 dans ce processus. Ainsi, Hunter *et al* ont montré une interaction de Vav2/3 avec le récepteur à l'éphrine A2. L'Ephrine A2 est un régulateur important

de l'angiogenèse physiologique et tumorale. Cette interaction de Vav2 avec le récepteur à l'éphrine aboutit à une activation de Rac1 qui permet l'interaction des cellules endothéliales et leur migration *in-vitro*. En outre, les souris invalidées pour Vav2/3 présentent une diminution du remodelage angiogénique en réponse à la stimulation par l'éphrine A2, ce qui démontre le rôle pro-angiogénique des protéines Vav (164).

Afin de déterminer l'implication des protéines Vav2/3 dans l'angiogenèse tumorale, ces chercheurs ont analysé *in-vivo* des modèles de cancers humains. Leurs résultats confirment le rôle de Vav2 et Vav3 dans le développement tumoral, notamment via la stimulation de la néo vascularisation et la survie des cellules cancéreuses. Ils ont en effet noté que la transplantation des cellules LLC (Lewis Lung Carcinoma cells) dans les souris invalidées pour Vav2/3 conduit au développement de tumeurs beaucoup moins volumineuses comparées à celles développées dans les souris sauvages. De plus, les cellules Vav2/3^{-/-} ont une capacité de migration réduite et sont incapables de s'incorporer aux vaisseaux sanguins tumoraux (165).

2.3.2 Tumorigenèse et métastase

Dans une étude récente, le groupe du Dr. Bustelo, a corroboré ce rôle de Vav2/3 dans l'angiogenèse, le maintien de la croissance tumorale et l'activation métastatique de cellules de cancer du sein. Pour le démontrer, les cellules ont été invalidées à l'aide d'ARN interférent pour Vav2 et/ou Vav3. Après injection dans des souris receveuses, ces lignées cellulaires dépourvues de protéines Vav développent des tumeurs dont la croissance est faible. De plus, la suppression de Vav2 et Vav3 abolit spécifiquement la progression métastatique vers le poumon des cellules cancéreuses tout en conservant la capacité d'envahir les ganglions lymphatiques et la rate. La réexpression à la fois de Vav2 et Vav3 dans ces cellules ré augmente la capacité tumorale et l'envahissement métastatique des poumons. Ces résultats ont été confirmés sur des cellules épithéliales mammaires de souris Vav2^{-/-} et Vav3^{-/-} transduites avec l'oncogène *PyMT* (Polyomavirus middle T antigen). Après ré injection dans les souris femelles, ces cellules primaires ne développent pas de tumeurs et ne sont pas métastatiques. Ce travail leur a aussi permis de montrer que les protéines Vav2/3 induisent la transcription par les cellules de cancer de seins, de gènes spécifiques de la progression métastatique vers les poumons. Il existe donc un rôle synergique des deux protéines Vav dans ce processus métastatique (166).

Les mécanismes par lesquels Vav2 et Vav3 régule le développement de tumeurs commencent donc à être caractérisés et nous conduit à appréhender leur rôle dans ces pathologies. Moins d'informations sont disponibles pour Vav1 dans les cellules non hématopoïétiques, malgré l'observation de son expression ectopique dans nombre de tumeurs.

3 Expression de Vav1 dans des cellules non hématopoïétiques et cancers

Bien que Vav1 ait été originellement identifiée par sa capacité à transformer les fibroblastes, aucune forme oncogénique similaire de Vav1 n'a été décrite chez l'Homme. En revanche, la dérégulation de son expression par différents mécanismes, ainsi que son expression « ectopique » hors du système hématopoïétique, sont associées à différentes tumeurs.

3.1 Expression de Vav1 dans les neuroblastomes

L'implication de Vav1 dans des tumeurs chez l'Homme a été initialement décrite dans une lignée puis des cellules primaires de neuroblastomes humains. L'ADN codant Vav1 retrouvée dans la lignée de neuroblastome SK-N-MYC ne présente ni réarrangement ni délétion. Des analyses biochimiques ont confirmé l'expression de Vav1 au niveau protéique et sa phosphorylation constitutive. De plus, Vav1 dans cette lignée de neuroblastome, conserve sa capacité d'interaction avec l'EGFR comme déjà mise en évidence dans les fibroblastes NIH3T3. Les analyses histochimiques réalisées sur des neuroblastomes humains confirment la présence de Vav1 dans de nombreux cas testés, bien que l'expression de Vav1 ne semble pas corrélée au stade clinique et ne puisse servir de marqueur pronostique de la maladie (167).

3.2 Expression de Vav1 dans les adénocarcinomes pancréatiques

Des études mécanistiques plus poussées ont été réalisées par l'équipe de D. Billadeau et coll. Elles avaient pour objectif d'identifier de nouvelles voies de signalisation permettant de décrire de possibles cibles à visée thérapeutique ou diagnostique dans le cancer du pancréas de type PDAC (Pancreatic ductular adenocarcinoma). Ces cancers sont fréquemment décrits pour présenter une surexpression des récepteurs aux facteurs de croissance et de leurs ligands ou pour porter des mutations activatrices de *K-Ras*. Ils ont analysé une possible implication de Vav1 dans la pathogenèse, sachant que les formes oncogéniques de Vav1 sont décrites pour agir en synergie avec Ras dans la transformation cellulaire.

Une expression ectopique de Vav1 a été décelée dans trois lignées cellulaires humaines et dans des tissus tumoraux du pancréas. L'expression de Vav1 est retrouvée dans plus de 50% des cellules épithéliales analysées par immunohistochimie. Cette expression ectopique de Vav1 est corrélée à une moins bonne survie des patients. L'expression ectopique de Vav1 détectée dans ces tumeurs, résulte de la déméthylation de son promoteur. Des expériences réalisées en présence d'ARN interférents dirigés contre Vav1 indiquent que l'absence de Vav1 dans les cellules tumorales CAPAN2 entraîne une diminution du volume des tumeurs formées après injection chez la souris. L'utilisation de shRNA dirigés contre Vav1 a démontré son rôle important et spécifique dans la prolifération et la survie des cellules tumorales pancréatiques. D'un point de vue

mécanistique, l'augmentation de prolifération implique l'activité d'échange de Vav1 sur Rac1 et l'activation de PAK1 ; ceci conduit à l'activation du facteur NFκB et l'activation transcriptionnelle de la cycline D1. Ces résultats ont identifié une voie de signalisation en réponse à la stimulation par l'EGF et qui implique la phosphorylation de Vav1 et l'activation en aval de la voie Rac1-Pak1-NFκB dans les cellules de cancer du pancréas (168).

3.3 Expression de Vav1 dans le cancer du poumon

L'expression de Vav1 dans les cancers du poumon a également été décrite. Une analyse génomique de lignées de cancers pulmonaires humains a montré l'expression de Vav1 dans 33 lignées pulmonaires sur les 78 testées. Ces résultats ont été confirmés sur des échantillons primaires de cancer de poumons humains par l'approche de « tissus array » (basée sur la technique d'immunohistochimie). Des niveaux variables d'expression de Vav1 sont retrouvés dans les différents types de cancers pulmonaires (adénocarcinomes, carcinomes squameux, carcinomes bronchioalvéolaires). Ainsi 35% des échantillons testés avaient une faible intensité de marquage cytoplasmique, 21% d'intensité modérée et 24.7% d'une très forte intensité de marquage.

La réduction de l'expression de Vav1 par la transfection de siRNA dans des lignées de carcinome bronchioalvéolaire qui l'expriment fortement, les lignées H358 ou H441, entraîne la diminution de leur capacité à croître sur l'agar et à la formation de clones beaucoup plus petits. Injectées chez la souris *nude*, les cellules traitées avec le siRNA dirigé contre Vav1 forment des tumeurs beaucoup moins volumineuses que celles obtenues en présence du siRNA contrôle. Vav1 dans ces cellules tumorales peut être stimulée par l'EGF et le TGFα, deux ligands de l'EGFR, ce qui conduit à sa phosphorylation. De manière analogue aux autres types de cancer associés à l'expression de Vav1, son activité d'échange sur Rac1 semble majoritairement impliquée (169).

3.4 Expression de Vav1 dans le cancer du sein

La caractérisation de l'expression de Vav1 dans le cancer du sein est issue d'analyses génomiques cherchant à définir des gènes pronostiques des différents types de cancers mammaires. *Vav1* est exprimée dans les lignées de type médullaire (MBC : Medullary Breast Cancer) mais absente dans les carcinomes (DBC : Ductal Breast Cancer) et dans les cellules épithéliales mammaires. Ces résultats ont été confirmés par une analyse en qPCR ainsi qu'une analyse de biopsies de tumeurs mammaires en immunohistochimie, révélant 3 tumeurs positives pour Vav1 sur les 5 testées (170).

Cette expression de Vav1 a également été mise en évidence dans une autre étude visant cette fois à définir l'expression potentielle de facteurs d'échange pour les GTPases Rho qui

pourrait être liée à la mobilité et à l'invasion des cellules tumorales mammaires. Les ARNm des trois facteurs d'échange Trio, Tiam-1 et Vav1 ont été retrouvés, mais seule l'expression de Trio et Tiam-1 a pu être confirmée en immunohistochimie, sans doute dû à un trop faible niveau d'expression de la protéine Vav1 dans ces tissus. L'expression de Vav1 a corrélé avec l'augmentation du statut métastatique de la tumeur, mais pas avec le pronostic vital (171).

Une étude récente sur des lignées de carcinomes mammaires a permis de rendre compte que l'impact de l'expression ectopique de Vav1 était aussi fonction du contexte cellulaire qui peut différenciellement activer certaines voies de signalisation par rapport à d'autres. Ainsi cette étude a montré que malgré l'expression importante d'ARNm de Vav1 dans la lignée AU565, la protéine n'est pas détectable, puisque majoritairement dégradée grâce à son interaction avec Cbl-c. Lorsqu'elle est surexprimée, Vav1 active cependant Rac1 dans ces cellules et permet un programme transcriptionnel de prolifération, alors qu'elle semble plutôt diminuer cette activation dans les cellules MCF7. Dans ces cellules MCF7, une voie liant l'EGF et Vav1 a été mise en évidence : elle conduit à la phosphorylation de l'adaptateur et à l'activation des kinases ERK, ainsi qu'à l'expression de gènes liés à l'apoptose. Il semblerait que les effets opposés de Vav1 dans ces deux contextes cellulaires soient basés sur le statut mutationnel de la protéine p53. La protéine sauvage est présente dans les cellules MCF-7 alors que les cellules AU565 expriment une forme mutée de p53 (172).

La protéine Vav1, dont l'expression physiologique est normalement restreinte au système hématopoïétique, peut donc être exprimée de manière ectopique dans de nombreux cancers humains. En revanche, la littérature rapporte très peu de mutations somatiques de Vav1 associées à des cancers, **Figure 28**. Les rares mutations mises en évidence sont issues majoritairement de cancers du poumon et en proportions égales de cancers du sein, de l'œsophage et du rein, **Figure 28**. Ces mutations ne représentent qu'un pourcentage infime de l'ensemble des cas analysés. Si l'on se réfère aux domaines fonctionnels de Vav1 touchés par ces mutations, celles-ci concernent de manière prépondérante le domaine DH-PH impliqué dans la fonction GEF. Un certain nombre de ces mutations concerne également le domaine adaptateur SH3-SH2-SH3, **Figure 29**. Une étude systématique de l'implication fonctionnelle de ces mutations n'a à ce jour pas encore été entreprise.

Tissu primaire	Echantillons avec Mutation	Echantillons répertoriés	% Mutés
Sein	3	1121	0.27
Poumon	5	935	0.53
Tissus lymphoïdes et Hématopoïétiques	0	887	0
Système Nerveux Central	0	830	0
Ovaire	0	659	0
Rein	3	542	0.55
Prostate	0	369	0
Gros intestin	1	273	0.37
Pancreas	0	229	0
Endomètre	2	227	0.88
Œsophage	3	173	1.73
Peau	1	138	0.72
Tractus aérodigestif supérieur	1	110	0.91
Tractus urinaire	1	102	0.98
Foie	0	71	0

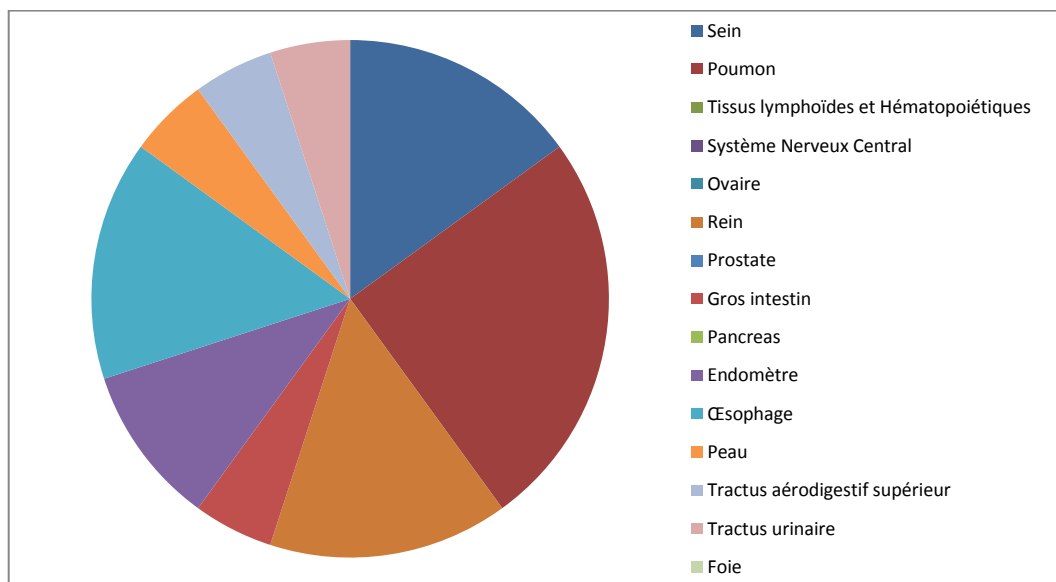
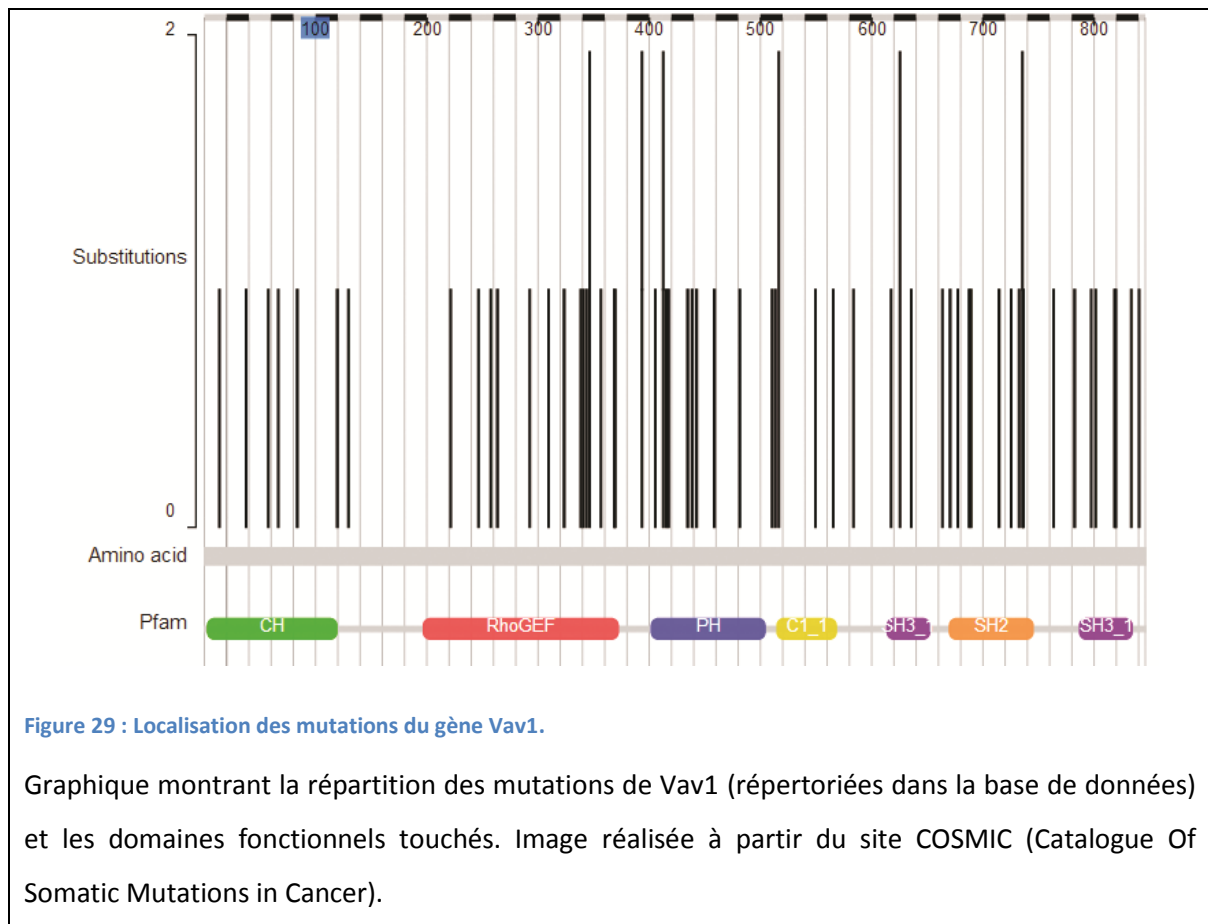


Figure 28 : Distribution des mutations de Vav1.

Le graphe (bas) est construit à partir du tableau (haut) qui répertorie quelques-unes des mutations de Vav1 rapportées dans la littérature. Le graphe illustre la distribution des mutations en fonction des tissus primaires dans lesquelles elles ont été isolées (d'après le site COSMIC).



L'expression ectopique de Vav1 dans les tissus non hématopoïétiques, semble donc avoir une implication fonctionnelle beaucoup plus importante que les mutations de Vav1 décrites. Les mécanismes physiologiques et pathologiques régulant l'expression de *vav1* (telle que la méthylation de son promoteur) commencent à être caractérisés (173). De même, de nombreux travaux ont tenté de déterminer à l'échelle moléculaire les mécanismes sous-jacents au développement de ces tumeurs. Néanmoins, il reste de nombreuses voies à explorer pour identifier finement l'ensemble des partenaires de Vav1 responsables de la transformation.

OBJECTIFS

Des avancées notables ont été réalisées sur la compréhension des fonctions de Vav1 et l'identification des processus qu'elle régule dans un contexte aussi bien physiologique que pathologique. La fonction GEF de Vav1 l'implique directement dans les processus nécessitant une réorganisation du cytosquelette, comme par exemple la formation de la synapse immunologique et l'adhésion des cellules immunitaires. Cette fonction GEF fait aussi intervenir Vav1 dans les voies de signalisations activées en aval des GTPases de la famille Rho qui régulent la prolifération et la migration cellulaire.

La dérégulation des fonctions de la majorité des facteurs d'échange est associée à de nombreuses pathologies et parmi elles, notamment, la tumorigenèse. C'est le cas de Vav1, dont l'expression est retrouvée au cours de la tumorigenèse de cellules non hématopoïétiques. Les effets pathogènes de Vav1 sont souvent liés à une dérégulation de la fonction GEF due à l'activation inappropriée par des facteurs extrinsèques.

En ce qui concerne la fonction adaptatrice de Vav1, peu de données actuellement disponibles traitent de son implication possible dans des pathologies ou dans le processus tumoral. Cependant la fonction adaptatrice de Vav1 est essentielle au recrutement de protéines membranaires ou intracellulaires qui pourront elles-mêmes constituer des partenaires potentiels nécessaires à la transformation cellulaire.

Les objectifs de ce travail ont donc été :

- D'évaluer la contribution de la fonction adaptatrice de Vav1 dans la capacité transformante de la protéine, notamment au travers de l'étude du domaine C-SH3.
- De mieux comprendre les mécanismes moléculaires auxquels Vav1 prend part dans des pathologies tumorales hématopoïétiques ou non, comme le cancer du poumon par la caractérisation de partenaires impliqués dans la tumorigenèse.

Résultats

Nous avons pu voir dans l'introduction que l'activation oncogénique de Vav1 peut résulter de la délétion du domaine CH comme le montre le potentiel transformant de la forme $\Delta 1-66$ identifiée par S. Katzav et coll. En outre, des délétions plus longues de la région N-ter confèrent une oncogénicité plus forte du fait de l'absence de régulation par la phosphorylation, de l'activité GEF (152). Ainsi, l'activation constitutive de la fonction GEF par troncation des domaines régulateurs au niveau N-terminal, est le seul mode d'activation de l'oncogénicité de Vav1 démontré jusqu'à présent. Cependant, plusieurs données suggèrent que la fonction adaptatrice de Vav1 et notamment le domaine CSH3, soit également importante pour la capacité transformante. Dans les travaux de Groysman *et al*, nous avons vu que les mutations sur des résidus essentiels à la structure du domaine CSH3 (comme la mutation des résidus Ala789 (A789N), ou Gly 830 (G830V) altèrent les propriétés transformant de la forme $\Delta 1-66$ (155). Cette étude a aussi démontré que cette perte du pouvoir transformant par les mutations du domaine CSH3 était associée à la perte de certaines interactions protéine-protéine.

Des études structurales et fonctionnelles ont été effectuées au laboratoire en introduisant des mutations touchant les résidus conservés Ala789 (A789N), Gly 830 (G830V) et Pro833 (P833L) ou spécifique à Vav1 Asp 797 (D797N), dans le domaine CSH3 du proto-oncogène Vav1. Ces mutations ont été introduites afin d'analyser l'importance du domaine CSH3 dans l'adressage nucléaire de Vav1 et sa participation à des complexes transcriptionnels dans les cellules hématopoïétiques. En effet, un mutant délété de tout le domaine joue un rôle dominant - négatif sur la formation de ces complexes. L'analyse de ces divers mutants a montré une localisation variable entre noyau et cytoplasme pour les protéines mutées. Fonctionnellement, à partir d'expériences avec des vecteurs rapporteurs luciférase sous contrôle du promoteur de l'IL2, il a été observé que le mutant P833L possédait un pouvoir activateur, même en l'absence de stimulation dans les cellules Jurkat. De manière intéressante, les mutants Ala789, Asp797 et Gly830 présentent également une forte activation de l'activité luciférase à des niveaux parfois supérieurs à ceux observés pour le mutant P833L et ce, même en l'absence de stimulation. Le promoteur distal de l'IL2 est sous le contrôle des facteurs NFAT et AP1 et les résultats du laboratoire montrent que ces mutations n'ont pas d'effet sur le flux calcique. Cette augmentation de l'activité luciférase serait donc dépendante de la voie Rac/ JNK/ AP1 ce qui suggère que les

mutations du domaine CSH3 pourraient permettre à elles seules une dérégulation de l'activité d'échange.

Ces résultats associés aux données de la littérature appuient l'importance du rôle adaptateur du domaine CSH3 dans le potentiel oncogénique de Vav1. Mon projet de thèse a donc consisté à analyser les effets de ces mutations sur la capacité transformante de Vav1 dans les cellules NIH3T3 et valider éventuellement l'existence d'une capacité transformante du proto-oncogène Vav1 activée par mutation du domaine CSH3. Dans un second temps mon projet a visé à caractériser les mécanismes moléculaires qui pouvaient être à la base de cette capacité transformante de Vav1.

Afin d'évaluer l'existence d'une capacité transformante du proto-oncogène Vav1 sous la dépendance du domaine CSH3, nous avons donc étudié les mutants :

- Ala789 (A789N) et Gly 830 (G830V) qui sont des mutations ponctuelles affectant des résidus essentiels et consensus des domaines SH3 ; on les retrouve aussi dans les domaines SH3 des kinases Src et Abl ou de l'adaptateur Grb2.
- Asp 797 (D797N), une mutation ponctuelle qui touche un résidu spécifique des 3 membres de la famille Vav que l'on ne retrouve pas dans les différents domaines SH3 des protéines citées précédemment.

Nous les avons exprimés dans les fibroblastes murins NIH3T3, dans le but d'observer la formation possible de foyers de cellules transformées en comparaison à ceux formés par onco-Vav. Nos résultats ont montré que parmi les mutants analysés, seul le mutant D797N portant sur un résidu spécifique de Vav1 est capable de former des foyers oncogéniques et comparables à ceux formés par onco-Vav. Ces cellules exprimant le mutant D797N, lorsqu'elles sont injectées dans les souris *nude*, induisent la formation de tumeurs. Ces résultats ont donc mis en évidence pour la première fois, l'existence d'un potentiel transformant du proto-oncogène Vav1 activé par une seule mutation dans le domaine CSH3 et non par délétion de domaine(s) régulateur(s) entier(s), comme c'est le cas pour onco-Vav.

En ce qui concerne les mécanismes moléculaires, nous avons vu que l'activation constitutive de la fonction GEF est le plus souvent à l'origine du potentiel transformant des facteurs d'échange. Dans le cas de Vav1, l'étude de la forme la plus oncogénique $\Delta 1-186$ a montré que les fonctions d'échange constitutive sur Rac1, RhoA et Cdc42 étaient impliquées dans la formation de foyers. Les voies de signalisations activées importantes pour la transformation étaient la voie JNK, la voie $\text{N}\kappa\text{KB}$ mais aussi la voie dépendante de Ras, impliquant le facteur de

transcription Elk-1 (174). Par ailleurs, en plus de l'implication classique de JNK dans l'activation de c-jun via la voie Rac, il existe des voies de signalisation non conventionnelles de JNK qui l'impliquent dans la modulation des jonctions d'adhérence. Dans une étude sur des kératinocytes primaires, il a été mis en évidence que JNK se lie au complexe de l'E-cadhérine avec la β -caténine et phosphoryle celle-ci sur les résidus S37 et T41. L'activation de JNK entraîne la diminution de l'adhésion des kératinocytes et favorise leur dispersion. En revanche, l'inhibition de JNK par l'utilisation de dominant-négatif (une forme de JNK dans laquelle l'activité kinase est abolie) renforce l'adhésion cellulaire et la formation de monocouches de cellules épithéliales (175). En plus de cette régulation des jonctions d'adhérence par JNK, des données de la littérature indiquent un lien entre les protéines Vav et les protéines d'adhésion de la famille des caténines. Notamment, il a été montré dans un modèle de fibroblaste que la p120 caténine est capable d'interagir avec Vav2. Cette interaction régule l'activité d'échange de Vav2 sur Rho et conduit à des modifications morphologiques importantes de ces cellules (176).

En se basant sur l'ensemble de ces données, nous avons orienté notre analyse mécanistique sur le mutant transformant de Vav1 : D797N. Nous avons voulu savoir si la contribution du domaine CSH3 dans le potentiel transformant de Vav1 était en relation avec une modulation de la fonction GEF. Nos résultats montrent que l'activité transformante du proto-oncogène Vav1 est médiée à la fois par son activité d'échange sur Rac1, mais également par sa fonction adaptatrice subordonnée au domaine CSH3. En effet, aussi bien le mutant D797N qu'onco-Vav activent les voies de signalisation de la kinase JNK et du facteur de transcription c-jun, *via* l'activation de Rac. Mais les deux formes de Vav activent aussi une signalisation non conventionnelle de JNK ciblant la β -caténine. Nous avons ainsi montré que JNK contribue à la phosphorylation de la β -caténine sur les résidus S33/37/T41 dans les fibroblastes. En outre, nous avons mis en évidence une interaction de Vav1 avec la β -caténine qui met en jeu le domaine SH2 de Vav1. Nos résultats démontrent un rôle de Vav1 sur la régulation de la répartition de la β -caténine à la membrane et de la phosphorylation de celle-ci dans le cytoplasme.

Notre étude est la première à mettre en évidence cette interaction de Vav1 avec la β -caténine et la régulation de la phosphorylation de celle-ci. Nous avons pu également retrouver cette interaction et la modulation de la phosphorylation de la β -caténine dans des lignées de cancer du poumon qui expriment de manière ectopique Vav1. De plus, Vav1 dans ces lignées, co-localise et interagit avec les constituants du complexe de jonction d'adhérence tels que l'E-cadhérine, la p120-caténine et l' α -caténine.

Fonctionnellement, cette étude a permis de confirmer l'importance des domaines d'homologie à Src dans les fonctions de Vav1, notamment dans la capacité transformante. Elle a également mis en évidence le recrutement d'un nouveau partenaire important pour la transformation : la β -caténine. Elle a défini une nouvelle implication de Vav1 avec le complexe de jonction d'adhérence dans les cellules épithéliales. Enfin, cette étude propose un modèle selon lequel l'expression ectopique de Vav1, dans un lignage autre que le système hématopoïétique, lui permet d'interagir avec des partenaires différents qui peuvent potentialiser son activité pro-tumorale.

Article: Alteration of the CSH3 domain of Vav1 activates its transforming potential

Alteration of the CSH3 domain of Vav1 activates its transforming potential

Lyra Razanadrakoto^{1,2*}, Françoise Cormier^{3,4,5*}, Vanessa Laurienté^{1,2}, Elisabetta Dondi^{1,2}, Laura Gardano^{1,2}, Veronique Baud^{3,4,5}, Shulamit Katzav⁶, Lionel Guittat^{1,2} and Nadine Varin-Blank^{1,2}.

1. Inserm U978, UFR SMBH, Bobigny, France
2. PRES SPC, Labex Inflammex, Université Paris 13, UFR SMBH, Bobigny, France
3. Inserm U1016, Institut Cochin, Paris, France
4. CNRS 8104, Paris, France
5. Université Paris Descartes, Paris, France
6. The Hebrew University/ Hadassah Medical School, Jerusalem, Israel

* These authors contributed equally to the experimental data, co-first authors

Corresponding authors:

Nadine Varin-Blank and Lionel Guittat

UMR U978 Inserm/Université Paris 13

UFR SMBH

74 rue Marcel Cachin

93017 Bobigny Cedex

France

Tel: 33(1) 48 38 88 51

Fax: (33) 1 48 38 76 69

Mail: nadine.varin@inserm.fr and lionel.guittat@univ-paris13.fr

Footnotes

The abbreviations used are: Src homology domain 3 (SH3); Antibody (Ab); GDP/GTP exchange factor (GEF); wild type (wt); dominant-negative (dn); c-jun NH2-terminal kinase (JNK)

Abstract

The Vav1 proto-oncogene is a key regulator of lymphoid development and impairment of its expression leads to signalling defects of immune and growth factors receptors. Vav family members function as remarkable scaffold proteins that exhibit both exchange activity for Rho/Rac GTPases and numerous protein-protein interactions via three adaptor Src-homology domains. The exchange activity is under the strict control of tyrosine residues phosphorylation and deletion of the regulatory N-terminal domain accounts for the potent focus-forming capacity of oncogenic Vav1 via the activation of Rho family proteins. The adaptor region of the protein has also been implicated in the regulation of the transforming activity. Here, we investigated the importance of the C-terminal SH3 domain and characterized one residue, specific of the Vav family, driving tumorigenicity of the proto-oncogene. Moreover, we show that the transforming activity of proto-Vav1 implies a non-degradative interaction of Vav with the cell junction protein β catenin. The interaction triggers the balance of β catenin between its adhesive and signalling functions toward the activation of its transforming potential.

Introduction

The Vav1 proto-oncogene has a restricted haematopoietic expression and exhibits both GTP-GDP exchange activity (GEF) for small GTPases and adaptor functions within signalling complexes (1, 2). Two other genes, Vav2 and Vav3 belong to the same family of signalling effectors and share high structural similarities and properties with Vav1. Vav2 and Vav3 have 50 and 70 percent homology with Vav1, respectively (3, 4). However, the two latter have a more ubiquitous expression with interacting partners in all tissues. Structurally, Vav proteins display characteristic domains that allow these interactions notably with receptors, signalling intermediates, cytoskeleton related proteins and nuclear factors (5). From N- to C-terminal ends, Vav proto-oncogenes comprise structural domains with homology for: Calponin (CH, an actin binding protein), Dbl (DH, an other small GTPases exchange factor), Pleckstrin (PH, a membrane binding protein). Between the CH- and DH-domains, an acidic residues-rich motive encompasses tyrosine residues, phosphorylated (pY) upon interaction between Vav and receptors or kinases, and regulates the exchange activity (6). A cysteine rich motive (CR) is also present and precedes the second specific feature of the adaptor proteins: three Src homology domains (SH) organized as SH3 (NSH3)-SH2-SH3 (CSH3). The initial characterization of Vav1 consisted in a truncated version of the proto-oncogene that resulted in a transforming protein when expressed in fibroblasts (7). The first 66 amino acids deletion within the CH domain identified this malignant activation during the course of a gene transfer assay aimed at determining the presence of transforming genes in human oesophageal carcinomas (8). In contrast, expression, even at higher levels, of the full-length proto-oncogene induces very low levels of morphological transformation. Further experimental truncation of the protein, deleting the CH domain (1-144 amino acids) activates its

transforming capacity that remains under the strict control of tyrosine phosphorylation upon receptors-mediated activation and signalling complex formation (9). Additional deletion toward the acidic-rich motive that contains these tyrosine residues (1-186 amino acids) abrogates the phosphorylation dependency of the transforming activity. Precisely, Tyr 174 has close contact with amino acids located in the DH domain that prevents a possible interaction with GTPases; its phosphorylation disrupts the interaction leading to the subsequent catalysis of GDP/GTP exchange on Rho/Rac proteins (6, 9-11). Taking into account the high similarities shared by the three members of the Vav family, transforming capacities in fibroblasts have also been described for truncated Vav2 and Vav3. However, both of them require more extensive deletion of the N-terminus to become oncogenically active (12). Truncation of the N-terminal region adjacent to the DH-domain of Dbl also activates its transforming potential (13). Additionally, the morphology of onco-Vav1 transformed cells strongly resembles those of cells transformed by the Dbl oncogene or active forms of Rho family GTPases. Thus, the transforming phenotype of Vav oncogenes has been ascribed to their GEF activity toward Rho family proteins (14). This oncogenic potentiation remains however of lower incidence as compared to Ras-mediated transformation. Several evidences indicate that protein-protein interactions mediated by other structural domains of Vav are also involved in transformation. Notably, the CR motive contributes to the stabilization of the DH domain and to an efficient GEF activity (11). Moreover, intact SH2 and SH3 domains are critical for the transforming potential of onco-Vav1 and mutations of residues conserved among these domains abrogate oncogenicity due notably to the loss of association with tyrosine phosphorylated proteins (15, 16). Interestingly, while these mutations abolish the transforming potential, mutation of a Vav-family specific residue (D797 in Vav1) in the CSH3 domain maintains the transforming properties of onco-Vav1 altogether with binding to several interacting

partners including cytoskeletal regulators or transcriptional modulators (17, 18). The oncogenic form of Vav1 has not been characterized in human tumours or haematopoietic malignancies so far. In parallel, several targeted therapies have shown, a restricted expression to haematopoietic lineages for transgenes under the control of the *vav1* promoter (19). An overexpression of wild-type Vav1 proto-oncogene has been described in patients exhibiting an evolutive form of B-cell chronic lymphocytic leukaemia with a 13q chromosomal deletion (20). Furthermore, an aberrant expression of wild-type Vav1 has been detected in a large number of human malignancies including neuroblastoma, melanoma, pancreatic ductal adenocarcinoma, adeno-, squamous cell - and bronchioalveolar carcinomas (21-24). Ectopic expression of Vav1 in pancreatic tumours is associated with a poor outcome and decreased survival of the patients. Higher levels of Vav1 RNA are also concomitant with a risk of multiple sclerosis and presence of a polymorphism in the CH domain (25). Interestingly, even in the presence of an oncogenic Kras, ablation of Vav1 using RNAi abrogated neoplastic proliferation in both pancreatic and lung cancer cells (21, 23). Therefore, the level of expression of the protein and its capacity to interact with a vast spectrum of proteins present in non-haematopoietic cells seem relevant indicators of the transforming potential of the protein and its implication in tumorigenesis.

Deregulation of Vav1 expression seems likewise at the origin of an abnormal cellular behaviour including changes in F-actin organization with enhanced GEF activity, loss of contact inhibition and tumorigenic properties of the cells. The observed transforming activity might be attributed to the specific expression and partnership of Vav1 in tissues that otherwise express the two other members of the Vav family. These observations prompted us to investigate whether specific structural determinants of Vav1 might account for a differential activating capacity. Mutational analysis of the regulatory CSH3 domain

has evidenced specific residues with critical role in transformation. In this study we investigated whether such mutational analysis within the regulatory domains might activate the transforming properties of the proto-oncogene. We identified the D797 residue in the CSH3 domain as essential for this potentiation. We also identified β -catenin and the junctional complexes as new Vav1 interacting partners in transformed fibroblasts and in pulmonary carcinoma cells with ectopic expression of Vav1. β -catenin interacted with the transforming mutated protein and the interaction accounted for the relocation of β -catenin and its balance toward signalling functions leading to tumorigenesis.

Materials and Methods

Mammalian expression plasmids and GST fusion proteins

The pEF-neo mammalian expression plasmids encoding the Myc-tagged human wt-Vav was previously described (26). The pEF-neo expression plasmid encoding the Δ 1-66 truncated oncogenic Vav (onco-Vav) was created by replacing the EcoRI/BstXI fragment from the pEF-wt-Vav by the the fragment derived from the pMexneo-oncoVav (7) kindly provided by Dr. S. Katzav (The Hebrew University, Israel). The pEF expression plasmids encoding a CSH3 mutant in the Myc-tagged human wt-Vav were created as follow : the pEF-Myc-tagged Vav A789N, D797N and G830V were obtained by replacing the wt fragment between Bsu361 and BstXI restriction sites in the ORF by a fragment containing the CSH3 mutant derived from the pMexneo onco-Vav A789N, D797N or G830V (16) kindly provided by Dr. S. Katzav (The Hebrew University, Israel). The pRK5 expression plasmids encoding the Myc-tagged Rac1(17N) and RhoA(19N) were kindly provided by O. Dorseuil (Institut Cochin, Paris, France). PCR amplified N-terminal Src homology (NSH3), SH2 and CSH3 or whole Src (SH) domains of Vav were subcloned in pGEX-4T-1 or pGEX-4T-3 (Pharmacia Biotech Inc.)

Antibodies and reagents

The antibodies for Myc-Tag, Vav1, JNK, p-JNK, p38, p-P38, lamin A/C, p- β -catenin S337/37/T41 and β -catenin-Alexa 647 conjugated antibody were obtained from Cell Signaling Technology. Anti-EEA1, anti-p120 catenin, mouse anti- β -catenin, mouse anti-IgG1 or anti-IgG2 isotype control were purchased from Becton Dickinson (BD), anti- α -catenin Ab was from Santa-Cruz, anti-actin and anti-tubulin Abs from Sigma. For

immunofluorescence, secondary Abs (Alexa-546, Alexa 488 or Alexa 647 conjugated affinity pure goat anti-mouse) were purchased from Invitrogen.

Cell culture

NIH-3T3 cells were cultured in DMEM supplemented with 10% Newborn Calf Serum (NCS ; Invitrogen and PAA). H358 and H441 cell lines were maintained in RPMI supplemented with 10% Foetal Bovine Serum (FBS; PAA). Stable NIH-3T3 cell lines expressing pEF -wt-Vav, -onco-Vav, or -Vav CSH3 mutants, were transfected using Lipofectamine-Plus reagent (Invitrogen) following the manufacturer's protocol and selected in DMEM-10% NCS containing 1 mg/ml neomycin. The neomycin-resistant clones were pooled after 12-14 days in selection medium to establish mass population of stably transfected cells. siRNA in H358 and H441 cells were transfected using the jetPRIME reagent (Polyplus). Cells were transfected with 50nM of control siRNA or Vav1 siRNA (Dharmacon) and proteins levels were assessed 72 hours after transfection by western blot analysis.

Focus formation assay

NIH-3T3 cells were seeded in 6-well dishes 24h prior gene transfer in DMEM-10% NCS. Cells were transfected with the indicated expression plasmids, using Lipofectamine-Plus reagent (Invitrogen). Twenty-four hours after transfection, cells were transferred in 60 mm-diameter dishes and cultured for 12-14 days in DMEM-5% NCS. The growth medium was eventually supplemented with the following drugs: SP600125 JNK inhibitor (Calbiochem), SB203580 p38 inhibitor (Calbiochem), at final concentrations of 5 to 20 μ M. Inhibitors were replaced every 2 or 3 days and transformed foci were scored after staining in Giemsa. To determine transfection efficiency, 1/10 of cells were split 24h after

transfection in 100 mm-diameter dishes in DMEM-10% NCS containing 1 mg/ml neomycin. Neomycin-resistant colonies were scored after 10-12 days of selection.

Clonal cultures in agar-containing growth medium

NIH-3T3 cells were seeded in semi-solid medium : DMEM-10%NCS containing 0,4% agar over a layer of DMEM-10%NCS containing 0,8% agar during 15-20 days. Growth medium was added every 7 days. Clones were observed under microscope (Nikon Eclipse TE200).

Tumorigenic assay in Nude mice

NIH-3T3 cells stably expressing the wt-Vav protein or the CSH3 mutants were subcutaneously injected in Nu/Nu mice. Development of tumours was monitored weekly. Tumours were isolated and weighted at various time after injection. The p value was calculated using GraphPad software.

Western blot analyses

Protein extracts were prepared in Triton lysis buffer (50mM Tris-HCL [pH 7.5], 150mM NaCl, 10% glycerol, 1mM EDTA, 0,1% Triton-X100, 10 µg/ml aprotinin, 5 µg/ml leupeptin, 5 µg/ml pepstatin, 1mM phenylmethyl sulfonyl fluoride, 1mM DTT, 25mM β-glycerophosphate, and 1mM Na₃VO₄). Protein concentration was determined using the BCA kit following the manufacturer's instructions. Lysates were separated by SDS-PAGE, transferred to Hybond membrane (Amersham) and probed with appropriate antibodies. Immunoblot were revealed with ECL or ECL-plus reagent (Amersham). Quantitation was performed with the Image Lab 4.10 (Bio-Rad) or Multi-gauge software (Fujifilm).

Stability assay using cycloheximide:

4×10^5 cells were seeded in 6-well dishes 24h prior to the treatment with 100uM cycloheximide. Cells were harvested at different times after drug addition: 2- 8 hours. Stability of the Vav mutant proteins was evaluated by western blot analysis of the lysates.

Immunoprecipitations

Cells stably expressing the different Vav proteins were lysed using ice-cold RIPA buffer (50mM Tris-HCL [pH 7.5], 150mM NaCl, 10% glycerol, 1mM EDTA, 1% Triton X-100, 10 µg/ml aprotinin, 5 µg/ml leupeptin, 5 µg/ml pepstatin, 1mM phenylmethyl sulfonyl fluoride, 1mM DTT, 1mM sodium fluoride and 20mM Na₃VO₄) for 15min on ice. An equivalent of 700ug of proteins was subjected to a preclearing step (1 hour). Clear cell lysates were incubated overnight with anti-c-Myc rabbit antibody, covalently bound to 4% Agarose beads (SIGMA) or with the indicated antibodies. The next day, beads were washed with RIPA buffer. Bound proteins were eluted with 20µl of 4X Laemli Buffer and subjected to western blot analysis.

GST pull-downs:

Expression of the Glutathione S-transferase (GST) fusion proteins was induced by the addition of 500µM of isopropyl-β-thiogalactopyranoside (IPTG) for 3 hours at 37°C. The fusion proteins were purified from bacterial lysates with glutathione-agarose beads (GE Healthcare). The equivalent of 200µg of proteins from NIH3T3 stable clones were incubated 2 hours with the fusion proteins bound to glutathione agarose beads. Bound proteins were recovered as described for immunoprecipitation experiments and analysed by western blot.

Subcellular Fractionation :

10⁷ cells stably expressing Vav proteins were incubated in hypertonic buffer (10mM Hepes, 1,5mM MgCl₂, 10mM KCl, 0.5mM DTT, 0.5mM phenylmethyl sulfonyl fluoride and antiproteases) for 10min on ice. Cells were then centrifuged for 10min at 3000rpm. Supernatants containing cytoplasmic proteins were collected and stored, while pellets were washed 3 times with Wash Nuclei Buffer (10mM Tris pH 7.4, 0.5% Triton X-100; 0.25mM sucrose, 6mM MgCl₂, 1mM phenylmethyl sulfonyl fluoride and anti-proteases). After centrifugation at 2500rpm for 7min at 4°C, pellets were resuspended in buffer containing 5mM Hepes, 1,5mM MgCl₂, 0.2mM EDTA, 0.5mM DTT, 26% glycerol (v/v) pH7.9, supplemented with NaCl at 400mM final concentration. Samples were sonicated (10 cycles of 30sec On, 30sec Off, low power) and left 30min on ice before centrifugation at 24 000g for 20min at 4°C. These lysates corresponded to nuclear fraction.

Immunofluorescence :

One day before experiment cells were seeded in 96-wells imaging plate. The next day, they were fixed (4% paraformaldehyde) and treated with 0.25% Triton X100. Intracellular Vav proteins in NIH3T3 cells were detected using primary antibody against Myc-Tag (1/1000 dilution, for 1 hour at RT). Cells were then washed and incubated with anti-βcatenin-Alexa 647 conjugated antibody (1:50 dilution, 1 hour at RT). Actin structures were visualized with phalloidin-TRITC conjugated and nuclei were counterstained with DAPI. H358 cells were stained with the indicated primary antibodies (1:200 dilution, 1h at RT) followed by anti-mouse- Alexa 647 conjugated secondary antibody (1:1000 dilution for 1h at RT). Images were acquired under BD Pathway 850 system at x40 objective. Analyses were achieved through the AttoVision and Image J softwares.

Real-Time Quantitative PCR:

Total RNA was isolated from NIH3T3 stable clones with Trizol reagent (Invitrogen). After a purification step using RNeasy Mini Kit (QUIAGEN), 1 μ g of total RNA was reverse transcribed following manufacturer's recommendations for the iScript cDNA Synthesis Kit (Biorad). Primers used for quantitative PCR were as follow: *axin2*, 5'-AGCGCCAACGACAGCGAGTT-3' and 5'-TCCCCATGCGGTAAGGAGGGAC-3'; *wnt9a*, 5'-CGCTCTAGCAAGGATTTGCG-3' and 5'-GCAAGTGGTTTCCACTCCAG-3'. Real Time quantitative PCR was performed on a 7500 Fast Real Time PCR system (Applied Biosystem), using SYBR Select Master Mix (Applied Biosystem) and following the manufacturer's protocol. Gene expression was normalized to *gapdh*.

Results

Mutation of the specific aspartic acid 797 residue in Vav1 C-SH3 domain activates its transforming and oncogenic potential.

The C-terminal SH3 adaptor region of Vav contains numerous conserved residues present in Src, Abl or Grb2 SH3 domains but also contains unique residues specific for Vav family members (Fig. 1a). We analyzed a variety of proto-oncogene Vav CSH3 mutants, D797N, A789N or G830V, for their capacity to form oncogenic foci when expressed in NIH3T3 cells and compared them to onco-Vav ($\Delta 1-66$). Interestingly, residue D797, when mutated showed significant transforming potential and similar foci morphology, albeit to a lesser extent than $\Delta 1-66$ onco-Vav (120 ± 30 versus 30 ± 15 foci). Despite equivalent transfection efficiencies, as verified by the obtention of comparable amounts of G418-resistant clones for the various constructs, none of the other mutants as well as wild-type Vav developed foci (Figure 1b, c and d). Immunoblot analysis confirmed that the transforming potential of the D797N mutant could not be ascribed to higher levels of protein expression. Either 2 days after transfection or in G418-selected stable clones D797N mutant and wt-Vav showed similar levels of expression and higher levels than onco-Vav that displayed the greatest transforming capacity (Figure 1c, e and f). Kinetic analysis of the mutated proteins in the presence of cyclohexamide confirmed the steady state levels observed in stable cell lines and showed a weaker stability for A789N or G830V when compared to D797N, onco Vav or wt-Vav (Supplemental Figure S1 and Figure 1f).

Next, we investigated the proliferative properties of the clones expressing these constructs. Higher proliferation rates were observed for the clones expressing the transforming proteins whereas wt-Vav exhibited an intermediate growth rate as compared

to control with vector only (Figure S2a). Moreover, unlike wt-Vav or control cells that showed poor proliferation rates in reduced serum conditions, cells expressing onco-Vav and D797N overgrew the monolayer and continued to proliferate beyond confluence (Figure S2b and c). The loss of contact-dependent growth inhibition was finally observed in agar cultures, with cells expressing onco-Vav or D797N mutant that accumulated in dense multilayers growing on top of one another. In contrast, wt-Vav expressing cells developed very few clones of reduced size as exemplified in Figure 2a. D797N-transformed fibroblasts also acquired a large capacity to generate tumours in Nu/Nu mice after subcutaneous injection. Weight of the tumours generated with onco-Vav and D797N was highly above those with wt-Vav or control vector when present (Figure 2b).

Altogether these data demonstrate that, in addition to the N-terminus deletion, one CSH3 specific mutation confers transforming and tumorigenic capacities to the Vav proto-oncogene.

Rac1 and RhoA GTPases –dependant pathways are activated in D797N-induced transformation

The transforming activity of all N-terminal deleted Vav oncoproteins (6, 27) has been ascribed to uncontrolled GEF activity on GTPases of the Rho family. Indeed, co-transfection of $\Delta 1-186$ onco-Vav with dominant-negative (dn) forms of Rac1 (RacN17) and RhoA (RhoN19) GTPases reduced foci formation (14). Therefore, we investigated whether D797N-mediated transformation might similarly depend on GEF activity. Cellular morphology and cytoskeleton labelling of onco-Vav or D797N transformed cells confirmed the activation of the GTPases with typical formation of ruffles (lamellipodia and filipodia) as seen in fibroblasts expressing activated Rac and RhoA (Figure 3a; (28)). These cells also exhibited a large reduction of stress fibres that were abundantly present in

wt-Vav vector expressing fibroblasts (Figure 3a, Pseudocolor). Dn RacN17 mutant when expressed together with Δ 1-66 onco-Vav or D797N strongly repressed foci formation. Similarly, co-transfection with RhoN19 caused a significant inhibition of foci formation albeit to a lesser extent that might be attributed to the weaker expression of the GTPase (Figure 3b and c).

To explore downstream events mediating the transforming phenotype, we investigated the activation of the c-jun NH2-terminal kinase (JNK), a direct effector of Vav and Rac/Rho GTPases, Western analyses using an antibody specific for phosphorylation of both JNK1 and 2 indicated an enhanced activation upon expression of onco-Vav or D797N (between two and three fold as compared to wt-Vav or control vector, Figure 4a). A weaker activation of p38 SAPK was also detected in the transformed cells (Figure S3a). Moreover, activation of the JNK kinases resulted in the phosphorylation of c-Jun, one of its important targets involved in cell proliferation and tumorigenesis. Immunoblotting using anti-phospho-ser63 c-Jun antibody indicated a strong activation in onco-Vav and D797N Vav expressing cells, while a weaker activation was noticed for wt-Vav (Figure 4c). Indeed, transcriptional activation of c-Jun was also revealed by a substantial induction of an AP1-based reporter construct for both transforming proteins. Some reporter expression was also observed in cells overexpressing wt-Vav (Figure 4d). Implication of the JNK kinase in the transforming phenotype was further confirmed using the SP600125 specific inhibitor. As shown in Figure 4b addition of 10 μ M SP600125 completely prevented foci formation in both onco-Vav and D797N expressing cells. Similarly, incubation with the inhibitor strongly repressed c-Jun activation (Figure 4c). In contrast, addition of 15 μ M SB203580, a p38 inhibitor, only reduced by two fold the number of foci (Figure S3b).

Altogether these results argue for the implication of the GEF activity of Vav toward Rac/Rho GTPases and for the subsequent activation of JNK-dependent pathways with

characteristic morphological shape of the cells exhibiting stretching and protruding upon expression of onco-Vav and D797N (Figure 3a).

β -catenin is a molecular target of Vav/JNK activation and a Vav1 interacting partner.

Next, we also analysed downstream targets of the Rac/JNK-mediated pathway that has proved relevant for cell contacts and adherence junctions. Both Rac1 and JNK2 are implicated in the dynamic regulation between the signalling activity and the structural function of the stable pools of β -catenin (29-32). Western analysis, using antibodies recognizing either β -catenin or its phosphorylated form at Ser33/37/Thr41 showed higher phosphorylation rate in all Vav-expressing cells. Phosphorylation was not associated with an overall reduction of β -catenin expression as reported for GSK3-mediated phosphorylation. In the presence of the JNK inhibitor, β -catenin phosphorylation was largely inhibited arguing for a role of JNK in the active modification rather than the degradation of β -catenin (Figure 5a). Therefore, we explored a possible interaction between Vav1 and the β -catenin. As shown in Figure 5b, small amounts of β -catenin were specifically detected in all Myc-tagged Vav immunoprecipitates. We also evidenced an interaction between Vav1 proteins and p120 catenin but failed to precipitate cadherin, two functional partners of the β -catenin present in clustered adhesion complexes (Figure S4 and data not shown). Using GST fusion proteins containing either all three or individual Src homology domains, we further restricted the interaction with β -catenin to the SH2 domain of Vav, while no interaction was seen with the two VavSH3 domains, supporting a role for tyrosine residues of the β -catenin in this interaction. Furthermore, introduction of the D797N mutation in the GST-SH fusion protein did not prevent the interaction (Figure 5c).

Vav1 influences β -catenin subcellular localization and signalling balance.

To further decipher the impact of Vav expression on the modulation of β -catenin functions, we first investigated the subcellular distribution of β -catenin in transfected NIH3T3. In vector-transfected cells, endogenous β -catenin was abundantly present at the cell membrane with a clustered accumulation at the sites of adhesion and cell-cell interfaces. Importantly, expression of Vav constructs resulted in a redistribution of β -catenin all along the membrane and in a decreased clustering. Random membrane expression was even more evident with the transformant proteins altogether with some accumulation within the cytoplasm and eventually in the nucleus (Figure 6a). These results were confirmed by biochemical subcellular fractionation. Remarkably, western blot analysis showed an increase of phosphorylated β -catenin in the cytoplasmic fraction and to a lesser extent in the nucleus in Vav expressing cells. Notably, onco-Vav and D797N expressing cells exhibited almost a 1:1 ratio between phospho β -catenin and β -catenin in these fractions. Moreover, substantial amounts of the D797N Vav mutant were also retrieved in the nuclear fraction (Figure 6b). Conversely, random localization within the membrane did not modify the overall amount of β -catenin in this fraction between Vav-transfectants (data not shown).

Next, according to the relocation of the β -catenin, its signalling capacity in terms of support to transcriptional response was also investigated. Quantitative real-time PCR was performed for two described β -catenin-mediated transcription target genes, *axin 2*, supposedly a universal Wnt- pathway target gene and *wtn9a* whose expression is also under the control of c-jun activation (33, 34). Expression of Axin2 was strongly repressed in all Vav-expressing cells relative to cells transfected with the vector. In contrast, Wnt9a expression was differentially up-regulated in the transfectants with a pronounced activation for the two transforming proteins where c-jun and AP1 activation were also observed

(Figure 6c and 4c-d). Thus, these results argue for a role for Vav upon β -catenin functions that might not only be relocalized but also functionally modified for its signalling aptitude as co-activator of transcription factors.

Ectopic expression of Vav1 allows its interaction with β -catenin in lung cancer cells

Ectopic expression of Vav1 is found in several non-haematopoietic cancer cells. Thus, we analysed whether the presence of Vav1 might account for some alteration of β -catenin functions in these cells. Pulmonary cancer cell lines expressing Vav1 and lymphoid cells were first tested for the expression and phosphorylation of β -catenin. As shown in Figure 7a, H358 and H441, two human lung carcinomas epithelial cell lines exhibited substantial amounts of Vav1 proteins. Remarkably, the two cell lines also presented significant levels of stabilized phosphorylated β -catenin, whereas lymphoid cells showed low levels of the protein (Figure 7b). In order to assess the impact of Vav1 on this phosphorylation, H358 and H441 cells were subjected to RNA interference for the protein. As compared to control SiRNA, transfection of Vav SiRNA resulted in decreased levels of phospho- β -catenin (Figure 7c and S5a). Furthermore, in these cells also, an interaction between Vav1 and β -catenin was observed. Vav1 immune precipitates in H358 and H441 contained also α -catenin, p120 catenin and E-cadherin, three counterparts of cell adhesion clusters (Figure 7d and S5b). Immunofluorescence analysis on H358 cells showed clustered accumulation of E-cadherin and p120 catenin at sites of cell-cell interface. Conversely, β -catenin was randomly distributed along the membrane and a decrease of surface labelling was observed in cells expressing highest levels of Vav1 (Figure 7e). These results suggest that interactions between Vav1 and β -catenin can be also observed in epithelial cancer cells

expressing ectopically Vav1 that might therefore modulate β -catenin balance between adhesive and signalling functions.

Discussion

This study highlights the essential role of the adaptor region of Vav1 not only as a scaffold protein for immune receptors signalosomes but also as a modulatory protein of tumorigenic process. Using the tool of a unique mutation of an aspartic acid residue specific for the Vav family of proteins we show that alteration of the Src-homology domains, in spite of the N-terminal regulatory domain deletion is able to activate the transforming capacity of the proto-oncogene. This gain of function mutation is established on a charged residue that is not among the consensus residues required for the structural integrity of the SH3 domains (16, 35). It is rather present on a hinge section available for interaction with negatively charged residues of other domains or proteins. Previous studies have already shown that mutation on this residue is not likely to affect interactions with several partners such as Ku70; we show here that the interaction with β -catenin is conserved with the mutant protein (36). Such alterations, able to activate the transforming activity have already been described for other SH-containing proteins and have been reported in human cancer. As an example, mutants of the kinases Src and Abl or of the exchange factor Dbl in domains adjacent to their catalytic domain are important activators of their oncogenic potential (37-39). So far, oncogenicity of Vav has been ascribed to an activation of its GEF activity following the deletion of the autoinhibitory loop present at the N-terminal extremity of the protein. The deletion allows further regulation of the GEF activity toward phosphorylation of tyrosine residues present within the acidic region. Another important feature of Vav is this phosphorylation dependency of the GEF activity (40).

The tyrosine residues have been shown as responsible for interactions with the DH domain. However, other tyrosine residues have now been shown as important for Vav functions and we could hypothesize that some intramolecular interactions might be mediated via residue D797, interacting with negative charges (41). Crystallographic resolution has not been possible so far with the whole molecule; however, various mutational or proteomic approaches have given insights to the regulation of Vav functions through conformational changes notably along with stimulation process (40, 42). It is important to notice that a previous study, addressing the role of the CSH3 domain in the transforming capacity of onco-Vav, showed the D797N mutant as the unique form still exhibiting oncogenicity (16). Regarding our results this capacity might be interpreted as pointing toward an interesting specific residue involved in a conformational activation of the protein. Several polymorphisms, mostly present in domains impacting either the GEF activity (CH, DH, PH) but also the Src adaptor region of Vav have been described in human cancers and it will be of interest to determine whether such mutations, similarly to the D797N, might activate the transforming capacity of the proto-oncogene.

Another important regulatory mechanism of the protein is its addressing to specific subcellular localisation. We have previously shown that nuclear translocation is under the control of a nuclear localization sequence present in the PH domain (26). Yet, this represents another specific feature of Vav. Noteworthy, we found in our analysis an important amount of the D797N mutant present in the nucleus. This result further argues for a conformational change of the protein due to the mutation.

Our study allowed the characterization of a new Vav1 interacting partner: β -catenin. Interaction is mediated by the SH2-domain of Vav likely recognising phosphorylated tyrosine residues of β -catenin. Multiple phosphorylated Ser/Thr or Tyr residues of β -catenin are involved in the complex regulation of the protein. Those include sequences

that, notably, contribute to conformational changes leading to the signalling functions or to recognition by proteasomal degradation complexes (43). Our results show that Vav1 expression activates the Rac/JNK pathway in fibroblasts and transforming mutants potentiate this effect. Activation of JNK allows phosphorylation of β -catenin at sites also recognized by GSK-3 β , an important intermediate for the capture and further degradation of the protein by the Axin-APC-driven complex (44). Here, we show that Vav-dependant JNK phosphorylation has rather a stabilizing effect on β -catenin. Similar effects of JNK have been described in keratinocytes together with an inhibitory role on the formation of clustered adhesive complexes with α -catenin and E-cadherin (31, 32). We show also the presence of p120-catenin in the Vav- β -catenin complex and a more random localisation of β -catenin along the membrane while active transforming mutants of Vav are expressed. Moreover, similar complexes, including E-cadherin, are observed in epithelial cancer cell lines regulating once again adhesion clusters. These results suggest that Vav and moreover its activated forms can, in this context, serve as an adaptor bridging the kinase with effector β -catenin that will no longer help cohesion of the cell-cell adhesion sites. Of interest, JNK2 is also responsible for phosphorylation at sites that regulate nuclear accumulation and signalling function of β -catenin (29). Blocking the phosphorylation results in an accumulation of β -catenin in adhesion sites at the membrane and in the perinuclear area. Remarkably, our immunofluorescence analysis showed an increased perinuclear β -catenin labelling in the presence of transforming forms of Vav. Since β -catenin does not contain nuclear localisation sequence, the activated forms of Vav, which have operated conformational changes releasing the NLS sequence, could help transport of the β -catenin to the nucleus. Transport of β -catenin to the nucleus has not been fully elucidated and level of expression of transporters seems an important regulation node for the balance between adhesive and signalling properties of the protein (45). D797N mutant

was expressed in lower amounts than onco-Vav in NIH3T3 cells and accumulation of β -catenin in the perinuclear area was accordingly more important with the mutant. Nevertheless, both transforming Vav proteins showed some nuclear translocation of β -catenin in addition to the stabilisation of the protein. Our results are therefore in agreement with a phosphorylation-dependent modulation and the presence (or not) of specific partners for the nuclear transport of β -catenin.

β -catenin, this new Vav partner, is not only an important protein involved in cell contact and inhibition but also signalling molecule acting through cooperation with transcriptional complexes as an important regulator during development and tumorigenesis (46, 47). The signalling function of the protein is also under the control of important conformational changes regulated by phosphorylation process to recruit important activators (48). Studies have described a number of possible interacting partners of the protein, including adherens junction and degradation-linked proteins but also transcription factors such as TCF/Lef or FOXO, which might compete with each other for binding to the 12 Armadillo repeats (43). Therefore, the cellular context and the presence of specific partners critically contribute to the signalling capacity of the protein (49). We show that in the context of Vav-expressing fibroblasts, transcription of Axin2, an important target of the β -catenin-TCF/Lef regulation, is inhibited. Down-regulation of this feedback inhibitory protein of β -catenin signalling might account for the stabilisation of β -catenin and contribute to oncogenicity (50). On the contrary, we observed an up-regulation of Wnt9 transcripts in this context. Wnt9 is an important target of β -catenin during morphogenesis and is also up-regulated by c-Jun (34). Indeed, we observed in this study a strong activation of c-Jun in a Vav-JNK dependent pathway. C-Jun is also, in cooperation with different partners such as Fos, responsible for the induction of targets involved in proliferation and oncogenicity. Moreover, cooperation between β -catenin signalling and AP1 has been described in the

expression of several genes implicated in tumour progression and metastasis (51, 52). Thereby, activation of the Vav-Rac-JNK pathway in our transforming context might serve as a modulator of the balance toward β -catenin-signalling and to the activation of transcription factors potentiating this signal (49, 53).

All of our results point to the importance of the expression and the activation of the different partners of both Vav and β -catenin in the balance of their functions between a physiological role during development or cell-contact inhibition and depending on the context their capacity to facilitate tumour progression. Since a single point mutation on the adaptor protein can modify this balance, Vav seems an interesting target to modulate dysregulated β -catenin signalling in oncogenesis of several human cancers.

Figures legends

Figure 1. Transforming potential of the Vav D797N C-SH3 mutant.

a. Sequence alignment of SH3 domains containing proteins. SH3 domains of Src, Grb2 and Abl are used as a reference for Vav1-2-3 C-terminal SH3 domains. Conserved residues of the domains are in bold. Stars and double string indicate the mutated residues used in the study. **b-c-d** Focus formation assays. 2 weeks after transfection of NIH-3T3 cells with the indicated constructs: cells were fixed, stained with Giemsa solution, observed using light microscopy (**b**, Nikon, magnification 20x; bar= 12 μ m) and the foci number was quantified (**c**) or were selected with neomycin and neo-resistant clones were assessed relative to transfection with empty vector (**d**). Results are representative of four independent experiments (mean \pm standard deviation). **e-f.** Vav proteins expression. 50 μ g of cell extract from (e) 48h transient transfections or (f) G418-selected stable cell lines expressing the

indicated myc-tagged mutants were sequentially analysed by immunoblot with anti-myc tag and anti-tubulin Abs.

Figure 2. Clonogenic and tumorigenic properties of the D797N mutant.

a. Clonogenic properties. NIH-3T3 cells stably transfected with the indicated constructs were cultured in agar as described in Materials and Methods. After 3 weeks, clonogenicity was observed using light microscopy (Nikon, magnification 20x; bar=12µm). **b.** Tumorigenic properties. Stable cell lines (10^6 cells) expressing the indicated constructs were injected subcutaneously in Nu/Nu mice. 3 weeks after injection, tumours when present were harvested and weighted. Columns represent tumour weight (mean for 4 mice in two independent experiments). Statistical significance was calculated using the *t* test (**p*= 0,02; ***p*= 0,003; ns : not significant *p*= 0,65).

Figure 3. Rac1 and RhoA GTPases are effectors for D797N-induced transformation

a. Immunofluorescence analysis. Cells transfected with the indicated plasmids were fixed and analysed using fluorescence microscopy after immunostaining with Phalloidin (upper panel) or anti-myc tag followed by alexa488 conjugated anti-mouse Ab (Vav, lower panel). Pseudocolor images indicate the intensity gradients of cytoskeleton labelling (middle panel). White arrows point to the ruffles accumulation. Bar= 12µm. **b- c.** Rac1 is required for transformation. NIH-3T3 cells were transfected with the Vav constructs (2µg/well) altogether with pRK5-myc based vectors (2µg/well): alone (vector) or encoding dn RacN17 or RhoN19 as indicated. **b.** Foci development was evaluated relative to empty vector (100%). Columns represent the mean of three independent experiments performed in duplicate. Statistical significance was calculated using the *t* test (onco-Vav: **p*=0.001, ***p*=0.016; D797N: **p*=0.004, ***p*= 0.106). **c.** Expression of RacN17 and RhoN19 proteins. Total cell lysates were prepared two days after cotransfection. 50µg of proteins

were analysed by immunoblotting with anti-myc tag Ab and reprobed with anti-tubulin Ab as a loading control.

Figure 4. The transforming potential of D797N requires a JNK-dependant pathway.

a and c. JNK and c-Jun phosphorylation analyses. Stable cell lines expressing the indicated constructs were analysed by sequential immunoblotting with (a) anti-phospho-JNK (Thr183/Tyr185) and anti-JNK Abs; (c) anti-phospho-c-Jun (Ser63) and anti-c-Jun Abs. Ratios indicate the levels of phospho-JNK1 or 2/JNK1 or 2 detected relative to empty vector (a) or phospho-c-jun phosphorylation/c-Jun level relative to empty vector using the multi-gauge software (c). Activation of c-Jun was assessed in cells cultured during 2 hours in the presence (+; 10 μ M) or not (-) of the JNK inhibitor SP600125 (10 μ M). **b.** JNK activity and transformation. A focus assay was performed with onco-Vav or D797N transfected NIH3T3 cells in the presence (5, 10 and 20 μ M) or not of SP600125. Percentage of foci formation is calculated relative to untreated cells (100%). Columns present the mean of three independent experiments performed in duplicate \pm standard deviation.

Figure 5. β -catenin is a molecular target of Vav/JNK activation.

a. β -catenin is a target of JNK. Total cell lysates (20 μ g) from NIH-3T3 cells expressing the indicated constructs and cultured in the presence (+) or not (-) of SP600125 (JNK inhibitor; 20 μ M) were analysed by sequential immunoblotting with anti-phospho- β -catenin (Ser33/37 Thr 41) and anti- β -catenin Abs. **b-c.** Vav and β -catenin are interacting partners. **b.** Lysates from the indicated transfected NIH3T3 were immunoprecipitated with anti-myc Ab. Immune complexes (upper panels) or total extracts (20 μ g, lower panel) were analysed by sequential immunoblotting with anti- β -catenin and anti-vav1 Abs. **c.** GST-pulldown experiment. GST-fusion proteins indicated in the upper panel were used to precipitate

NIH-3T3 total cell extracts. Interacting β -catenin was resolved by immunoblotting, Total extract was used as a control of expression (Input) and ponceau red labelling attests for the equal amounts of fusion proteins used. GST SH-D797N is a GST fusion protein of the entire Src homology region where mutation D797N has been introduced.

Figure 6. Vav1 influences β -catenin subcellular localization and signalling balance.

Cells transfected with the indicated plasmids were analysed using (a). Immunofluorescence microscopy after immunostaining with anti β -catenin and alexa 647 secondary Ab (upper panel) or anti-myc tag followed by alexa488 conjugated anti-mouse Ab (Vav, lower panel). Pseudocolor images indicate the intensity gradients of β -catenin labelling (middle panel). Bar= 12 μ m. b. Sequential western analysis with the indicated Abs after subcellular fractionation between cytoplasmic (C) and nuclear (N) fractions. c. Quantitative RT-PCR for Axin 2 and Wnt9a RNA expression. Expression was calculated relative to levels detected in empty vector transfected cells, results are the mean values of three independent experiments performed in triplicates.

Figure 7. Ectopic expression of Vav1 allows its interaction with β -catenin in lung cancer cells

a-c. Western analysis. (a,b). Cell extracts from various cell lines were analysed by sequential immunoblotting with the indicated Abs. c. H358 cells transfected with the indicated SiRNA were similarly analysed. d. Immunoprecipitation. Lysates from the indicated cells were immunoprecipitated with anti-Vav Ab or control IgG. Immune complexes or total extracts were analysed by sequential immunoblotting with the indicated Abs e. Immunofluorescence microscopy on H358 cells transfected with Vav-GFP construct and immunostained with the indicated Abs followed by alexa 647 secondary Ab. A merged image of fluorescence is presented (right panel). Bar= 12 μ m.

Figure S1. Stability of Vav mutant proteins

Stable cell lines expressing the indicated constructs were treated with cyclohexamide for the indicated periods of time and lysed. Cellular extracts (equivalent to 10^5 cells) were analysed for the Vav-content by immunoblot with anti-myc Ab and reprobed with anti-actin for loading control.

Figure S2. Transformed phenotype of the D797N expressing cells.

Growth capacity of NIH3T3 stable clones expressing wt-, or mutant Vav. Exponentially growing cells were seeded in 6-well plates in duplicates. Cells were counted at the indicated times. **a.** 2.5×10^4 cells /well in regular medium. **b.** 1×10^5 cells /well in low serum conditions; one day after seeding, medium was replaced by 0,5% NCS containing medium. Each value represents the mean of cells counted in the two wells \pm standard deviation from one representative of three independent experiments. **c.** Growth rate at day 7 in low serum conditions. Values represent the mean percentage of cell development in two independent experiments relative to onco-Vav assigned to 100% growth.

Figure S3. P38 activation is not mandatory for D797N transformation.

a. p38 phosphorylation analysis. Stable cell lines expressing the indicated constructs were analysed by sequential immunoblotting with anti-phospho-p38 (Thr180/Tyr182) and anti-p38 antibodies.**b.** p38 activity and transformation. A focus assay was performed with onco-Vav or D797N transfected NIH-3T3 cells in the presence (5, 10 and 15 μ M) or not of SB203580 (p38 inhibitor). Percentage of foci formation is calculated relative to untreated cells (100%). Columns present the mean of three independent experiments performed in duplicate \pm standard deviation.

Figure S4. Vav1 interacts with p120-catenin in NIH3T3 cells.

Lysates from the indicated transfected NIH3T3 were immunoprecipitated with anti-myc Ab. Immune complexes (upper panels) or total extracts (20 μ g, lower panel) were analysed by immunoblotting with anti-p120- catenin and anti-vav1 Abs.

Figure S5. Activation of β -catenin in H441 cells.

a. Western blot. H441 cells transfected with the indicated SiRNA were analysed by sequential immunoblotting with the indicated Abs. **b.** Immunoprecipitation. Lysates from H441 cells were immunoprecipitated with anti-vav Ab or control IgG. Immune complexes or total extracts (Input) were analysed by sequential immunoblotting with the indicated Abs.

References:

1. Turner, M., and Billadeau, D. D. (2002) VAV proteins as signal integrators for multi-subunit immune-recognition receptors. *Nature reviews. Immunology* **2**, 476-486
2. Katzav, S. (2007) Flesh and blood: the story of Vav1, a gene that signals in hematopoietic cells but can be transforming in human malignancies. *Cancer letters* **255**, 241-254
3. Schuebel, K. E., Bustelo, X. R., Nielsen, D. A., Song, B. J., Barbacid, M., Goldman, D., and Lee, I. J. (1996) Isolation and characterization of murine vav2, a member of the vav family of proto-oncogenes. *Oncogene* **13**, 363-371
4. Movilla, N., and Bustelo, X. R. (1999) Biological and regulatory properties of Vav-3, a new member of the Vav family of oncoproteins. *Molecular and cellular biology* **19**, 7870-7885
5. Bustelo, X. R. (2000) Regulatory and signaling properties of the Vav family. *Molecular and cellular biology* **20**, 1461-1477
6. Crespo, P., Schuebel, K. E., Ostrom, A. A., Gutkind, J. S., and Bustelo, X. R. (1997) Phosphotyrosine-dependent activation of Rac-1 GDP/GTP exchange by the vav proto-oncogene product. *Nature* **385**, 169-172
7. Katzav, S., Martin-Zanca, D., and Barbacid, M. (1989) vav, a novel human oncogene derived from a locus ubiquitously expressed in hematopoietic cells. *The EMBO journal* **8**, 2283-2290
8. Coppola, J., Bryant, S., Koda, T., Conway, D., and Barbacid, M. (1991) Mechanism of activation of the vav protooncogene. *Cell growth & differentiation : the molecular biology journal of the American Association for Cancer Research* **2**, 95-105
9. Katzav, S., Cleveland, J. L., Heslop, H. E., and Pulido, D. (1991) Loss of the amino-terminal helix-loop-helix domain of the vav proto-oncogene activates its transforming potential. *Molecular and cellular biology* **11**, 1912-1920
10. Aghazadeh, B., Lowry, W. E., Huang, X. Y., and Rosen, M. K. (2000) Structural basis for relief of autoinhibition of the Dbl homology domain of proto-oncogene Vav by tyrosine phosphorylation. *Cell* **102**, 625-633

11. Rapley, J., Tybulewicz, V. L., and Rittinger, K. (2008) Crucial structural role for the PH and C1 domains of the Vav1 exchange factor. *EMBO reports* **9**, 655-661
12. Schuebel, K. E., Movilla, N., Rosa, J. L., and Bustelo, X. R. (1998) Phosphorylation-dependent and constitutive activation of Rho proteins by wild-type and oncogenic Vav-2. *The EMBO journal* **17**, 6608-6621
13. Ron, D., Graziani, G., Aaronson, S. A., and Eva, A. (1989) The N-terminal region of proto-dbl down regulates its transforming activity. *Oncogene* **4**, 1067-1072
14. Palmby, T. R., Abe, K., Karnoub, A. E., and Der, C. J. (2004) Vav transformation requires activation of multiple GTPases and regulation of gene expression. *Molecular cancer research : MCR* **2**, 702-711
15. Katzav, S. (1993) Single point mutations in the SH2 domain impair the transforming potential of vav and fail to activate proto-vav. *Oncogene* **8**, 1757-1763
16. Groysman, M., Nagano, M., Shaanan, B., and Katzav, S. (1998) Mutagenic analysis of Vav reveals that an intact SH3 domain is required for transformation. *Oncogene* **17**, 1597-1606
17. Hobert, O., Jallal, B., Schlessinger, J., and Ullrich, A. (1994) Novel signaling pathway suggested by SH3 domain-mediated p95vav/heterogeneous ribonucleoprotein K interaction. *The Journal of biological chemistry* **269**, 20225-20228
18. Romero, F., Dargemont, C., Pozo, F., Reeves, W. H., Camonis, J., Gisselbrecht, S., and Fischer, S. (1996) p95vav associates with the nuclear protein Ku-70. *Molecular and cellular biology* **16**, 37-44
19. Adams, J. M., Harris, A. W., Strasser, A., Ogilvy, S., and Cory, S. (1999) Transgenic models of lymphoid neoplasia and development of a pan-hematopoietic vector. *Oncogene* **18**, 5268-5277
20. Prieto-Sanchez, R. M., Hernandez, J. A., Garcia, J. L., Gutierrez, N. C., San Miguel, J., Bustelo, X. R., and Hernandez, J. M. (2006) Overexpression of the VAV proto-oncogene product is associated with B-cell chronic lymphocytic leukaemia displaying loss on 13q. *British journal of haematology* **133**, 642-645
21. Fernandez-Zapico, M. E., Gonzalez-Paz, N. C., Weiss, E., Savoy, D. N., Molina, J. R., Fonseca, R., Smyrk, T. C., Chari, S. T., Urrutia, R., and Billadeau, D. D. (2005) Ectopic expression of VAV1 reveals an unexpected role in pancreatic cancer tumorigenesis. *Cancer cell* **7**, 39-49

22. Bartolome, R. A., Molina-Ortiz, I., Samaniego, R., Sanchez-Mateos, P., Bustelo, X. R., and Teixido, J. (2006) Activation of Vav/Rho GTPase signaling by CXCL12 controls membrane-type matrix metalloproteinase-dependent melanoma cell invasion. *Cancer research* **66**, 248-258
23. Lazer, G., Idelchuk, Y., Schapira, V., Pikarsky, E., and Katzav, S. (2009) The haematopoietic specific signal transducer Vav1 is aberrantly expressed in lung cancer and plays a role in tumorigenesis. *The Journal of pathology* **219**, 25-34
24. Hornstein, I., Pikarsky, E., Groysman, M., Amir, G., Peylan-Ramu, N., and Katzav, S. (2003) The haematopoietic specific signal transducer Vav1 is expressed in a subset of human neuroblastomas. *The Journal of pathology* **199**, 526-533
25. Jagodic, M., Colacios, C., Nohra, R., Dejean, A. S., Beyeen, A. D., Khademi, M., Casemayou, A., Lamouroux, L., Duthoit, C., Papapietro, O., Sjöholm, L., Bernard, I., Lagrange, D., Dahlman, I., Lundmark, F., Oturai, A. B., Soendergaard, H. B., Kempainen, A., Saarela, J., Tienari, P. J., Harbo, H. F., Spurkland, A., Ramagopalan, S. V., Sadovnick, D. A., Ebers, G. C., Seddighzadeh, M., Klareskog, L., Alfredsson, L., Padyukov, L., Hillert, J., Clanet, M., Edan, G., Fontaine, B., Fournie, G. J., Kockum, I., Saoudi, A., and Olsson, T. (2009) A role for VAV1 in experimental autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis. *Sci Transl Med* **1**, 10ra21
26. Houlard, M., Arudchandran, R., Regnier-Ricard, F., Germani, A., Gisselbrecht, S., Blank, U., Rivera, J., and Varin-Blank, N. (2002) Vav1 is a component of transcriptionally active complexes. *The Journal of experimental medicine* **195**, 1115-1127
27. Crespo, P., Bustelo, X. R., Aaronson, D. S., Coso, O. A., Lopez-Barahona, M., Barbacid, M., and Gutkind, J. S. (1996) Rac-1 dependent stimulation of the JNK/SAPK signaling pathway by Vav. *Oncogene* **13**, 455-460
28. Ridley, A. J., Paterson, H. F., Johnston, C. L., Diekmann, D., and Hall, A. (1992) The small GTP-binding protein rac regulates growth factor-induced membrane ruffling. *Cell* **70**, 401-410
29. Wu, X., Tu, X., Joeng, K. S., Hilton, M. J., Williams, D. A., and Long, F. (2008) Rac1 activation controls nuclear localization of beta-catenin during canonical Wnt signaling. *Cell* **133**, 340-353

30. Esufali, S., and Bapat, B. (2004) Cross-talk between Rac1 GTPase and dysregulated Wnt signaling pathway leads to cellular redistribution of beta-catenin and TCF/LEF-mediated transcriptional activation. *Oncogene* **23**, 8260-8271
31. Lee, M. H., Koria, P., Qu, J., and Andreadis, S. T. (2009) JNK phosphorylates beta-catenin and regulates adherens junctions. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **23**, 3874-3883
32. Lee, M. H., Padmashali, R., Koria, P., and Andreadis, S. T. (2011) JNK regulates binding of alpha-catenin to adherens junctions and cell-cell adhesion. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **25**, 613-623
33. Jho, E. H., Zhang, T., Domon, C., Joo, C. K., Freund, J. N., and Costantini, F. (2002) Wnt/beta-catenin/Tcf signaling induces the transcription of Axin2, a negative regulator of the signaling pathway. *Molecular and cellular biology* **22**, 1172-1183
34. Kan, A., and Tabin, C. J. (2013) c-Jun is required for the specification of joint cell fates. *Genes & development* **27**, 514-524
35. Agrawal, V., and Kishan, K. V. (2002) Promiscuous binding nature of SH3 domains to their target proteins. *Protein and peptide letters* **9**, 185-193
36. Romero, F., Germani, A., Puvion, E., Camonis, J., Varin-Blank, N., Gisselbrecht, S., and Fischer, S. (1998) Vav binding to heterogeneous nuclear ribonucleoprotein (hnRNP) C. Evidence for Vav-hnRNP interactions in an RNA-dependent manner. *The Journal of biological chemistry* **273**, 5923-5931
37. Erpel, T., Superti-Furga, G., and Courtneidge, S. A. (1995) Mutational analysis of the Src SH3 domain: the same residues of the ligand binding surface are important for intra- and intermolecular interactions. *The EMBO journal* **14**, 963-975
38. Brasher, B. B., Roumiantsev, S., and Van Etten, R. A. (2001) Mutational analysis of the regulatory function of the c-Abl Src homology 3 domain. *Oncogene* **20**, 7744-7752
39. Yohe, M. E., Rossman, K., and Sondek, J. (2008) Role of the C-terminal SH3 domain and N-terminal tyrosine phosphorylation in regulation of Tim and related Dbl-family proteins. *Biochemistry* **47**, 6827-6839
40. Tybulewicz, V. L. (2005) Vav-family proteins in T-cell signalling. *Curr Opin Immunol* **17**, 267-274

41. Llorca, O., Arias-Palomo, E., Zugaza, J. L., and Bustelo, X. R. (2005) Global conformational rearrangements during the activation of the GDP/GTP exchange factor Vav3. *The EMBO journal* **24**, 1330-1340
42. Bustelo, X. R. (2002) Regulation of Vav proteins by intramolecular events. *Front Biosci* **7**, d24-30
43. Valenta, T., Hausmann, G., and Basler, K. (2012) The many faces and functions of beta-catenin. *The EMBO journal* **31**, 2714-2736
44. Wu, G., and He, X. (2006) Threonine 41 in beta-catenin serves as a key phosphorylation relay residue in beta-catenin degradation. *Biochemistry* **45**, 5319-5323
45. Fagotto, F. (2013) Looking beyond the Wnt pathway for the deep nature of beta-catenin. *EMBO reports* **14**, 422-433
46. Reya, T., Duncan, A. W., Ailles, L., Domen, J., Scherer, D. C., Willert, K., Hintz, L., Nusse, R., and Weissman, I. L. (2003) A role for Wnt signalling in self-renewal of haematopoietic stem cells. *Nature* **423**, 409-414
47. Roose, J., and Clevers, H. (1999) TCF transcription factors: molecular switches in carcinogenesis. *Biochimica et biophysica acta* **1424**, M23-37
48. Xing, Y., Takemaru, K., Liu, J., Berndt, J. D., Zheng, J. J., Moon, R. T., and Xu, W. (2008) Crystal structure of a full-length beta-catenin. *Structure* **16**, 478-487
49. Railo, A., Pajunen, A., Itaranta, P., Naillat, F., Vuoristo, J., Kilpelainen, P., and Vainio, S. (2009) Genomic response to Wnt signalling is highly context-dependent-evidence from DNA microarray and chromatin immunoprecipitation screens of Wnt/TCF targets. *Experimental cell research* **315**, 2690-2704
50. Hatzis, P., van der Flier, L. G., van Driel, M. A., Guryev, V., Nielsen, F., Denissov, S., Nijman, I. J., Koster, J., Santo, E. E., Welboren, W., Versteeg, R., Cuppen, E., van de Wetering, M., Clevers, H., and Stunnenberg, H. G. (2008) Genome-wide pattern of TCF7L2/TCF4 chromatin occupancy in colorectal cancer cells. *Molecular and cellular biology* **28**, 2732-2744
51. Klapholz-Brown, Z., Walmsley, G. G., Nusse, Y. M., Nusse, R., and Brown, P. O. (2007) Transcriptional program induced by Wnt protein in human fibroblasts suggests mechanisms for cell cooperativity in defining tissue microenvironments. *PloS one* **2**, e945

52. Toualbi, K., Guller, M. C., Mauriz, J. L., Labalette, C., Buendia, M. A., Mauviel, A., and Bernuau, D. (2007) Physical and functional cooperation between AP-1 and beta-catenin for the regulation of TCF-dependent genes. *Oncogene* **26**, 3492-3502
53. Bottomly, D., Kyler, S. L., McWeeney, S. K., and Yochum, G. S. (2010) Identification of {beta}-catenin binding regions in colon cancer cells using ChIP-Seq. *Nucleic acids research* **38**, 5735-5745

Figure 1: Razanadrakoto and al.

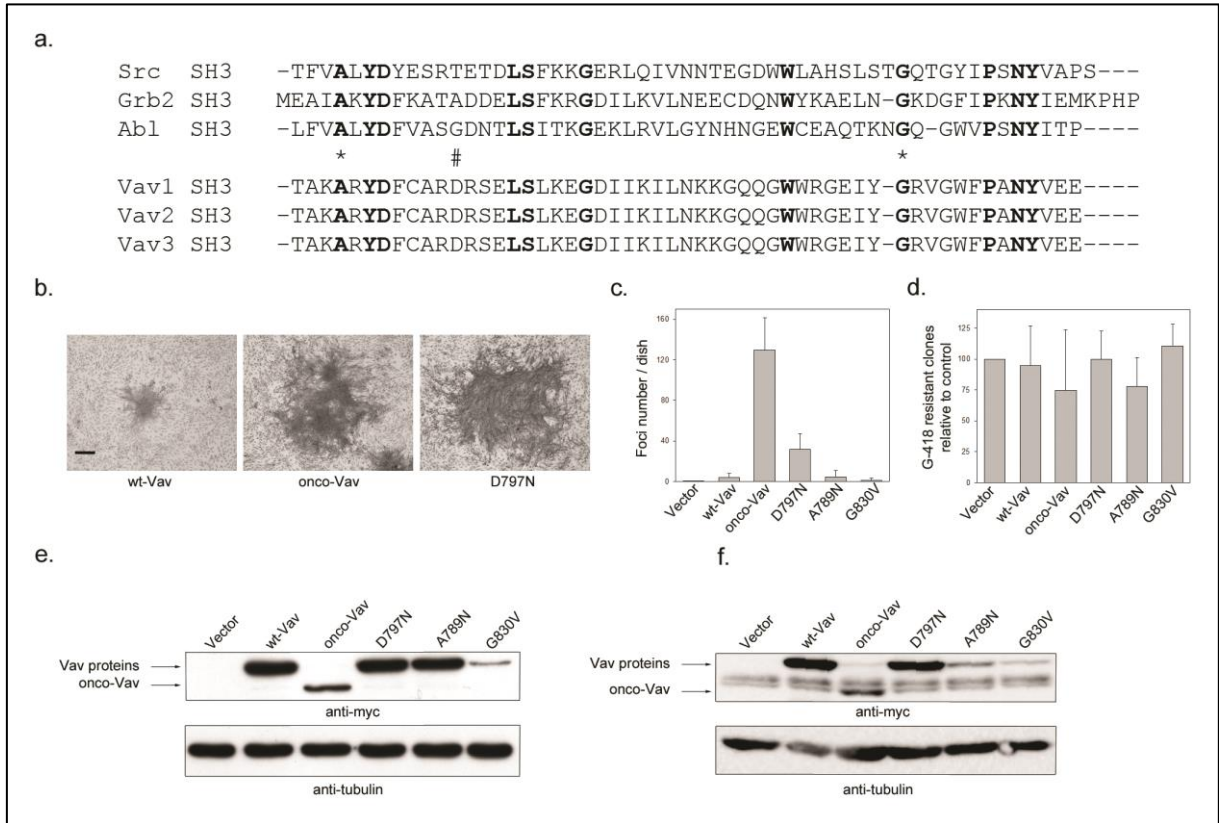


Figure 2: Razanadrakoto and al.

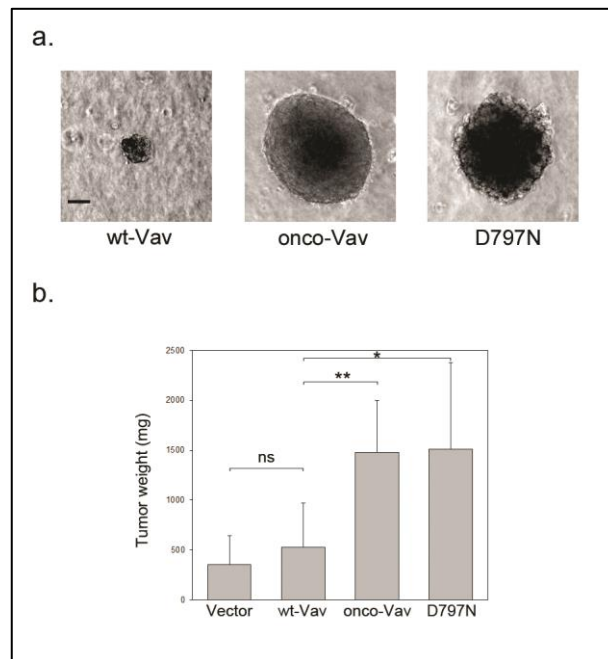


Figure 3: Razanadrakoto and al.

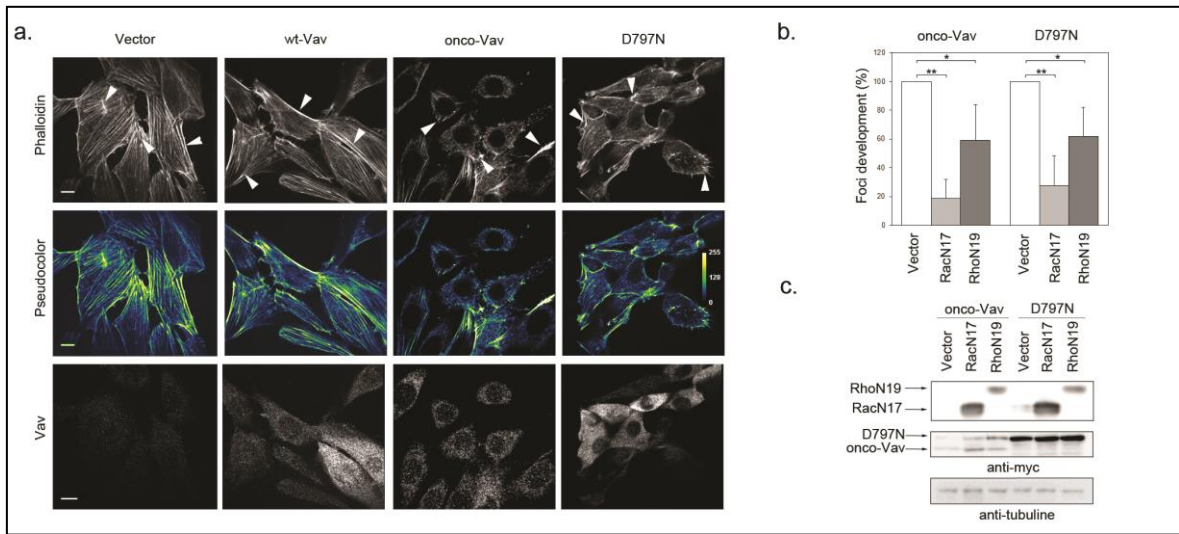


Figure 4: Razanadrakoto and al.

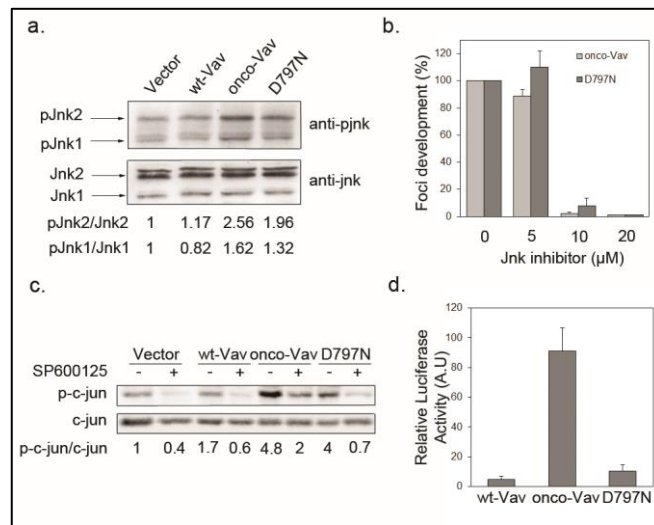


Figure 5: Razanadrakoto and al.

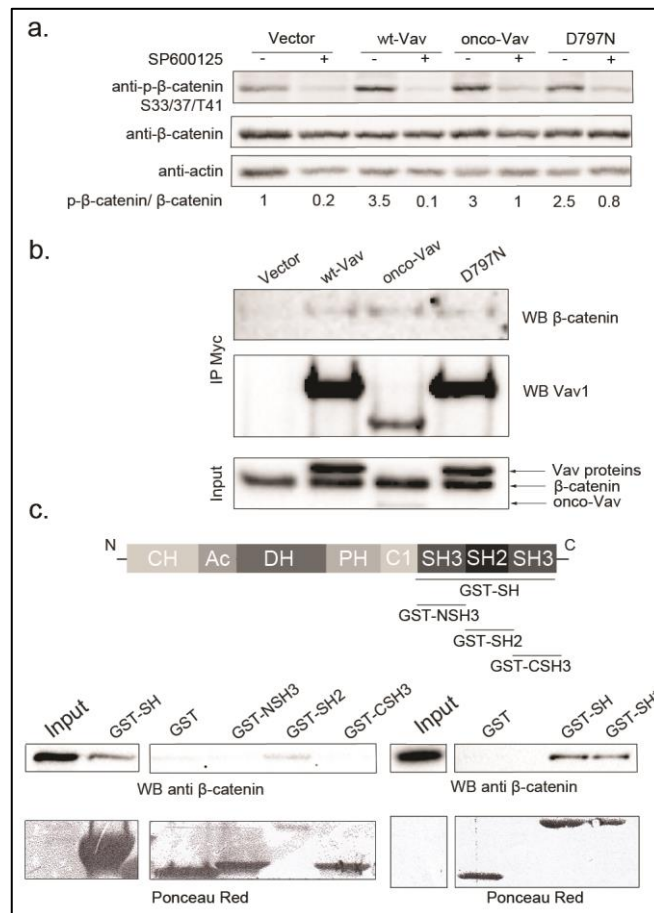


Figure 6: Razanadrakoto and al.

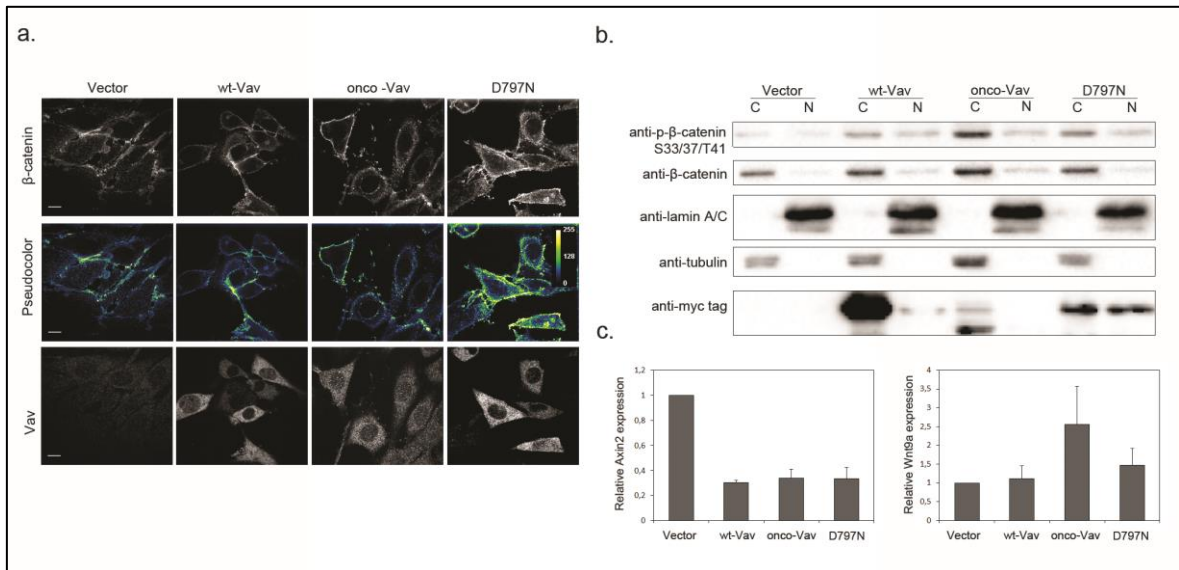
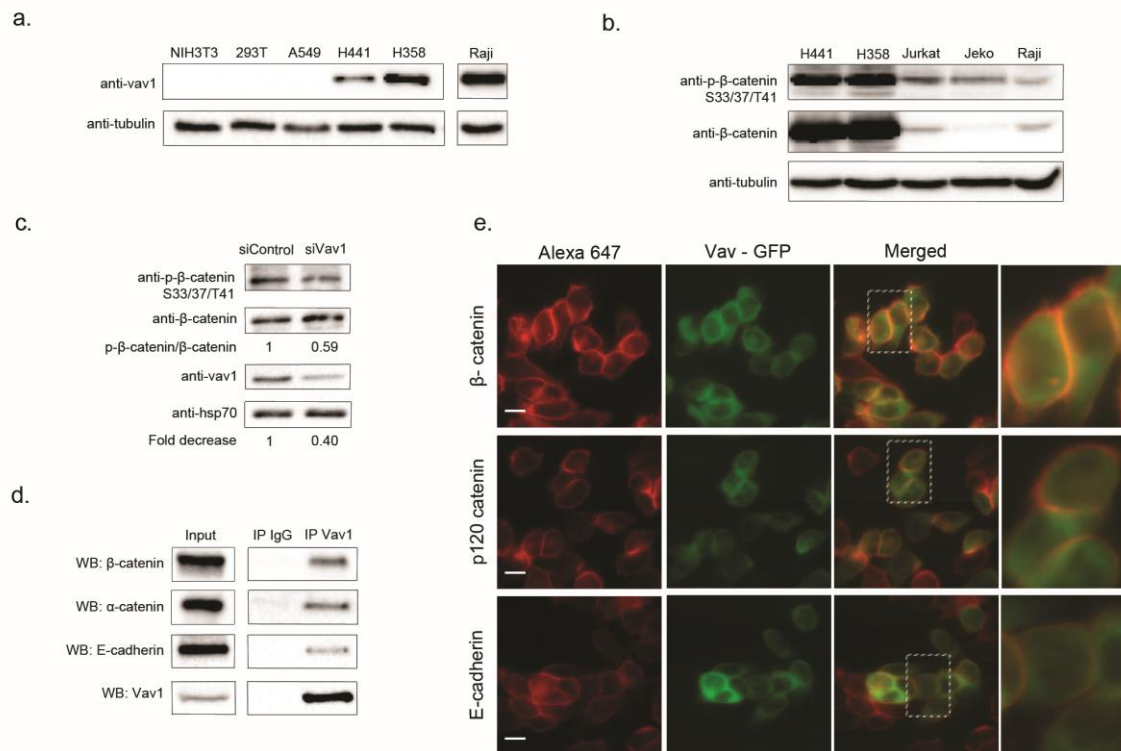
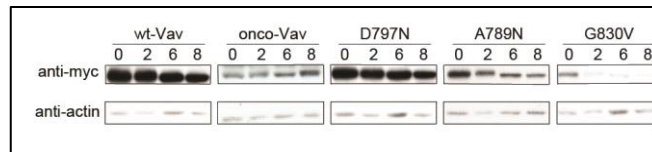


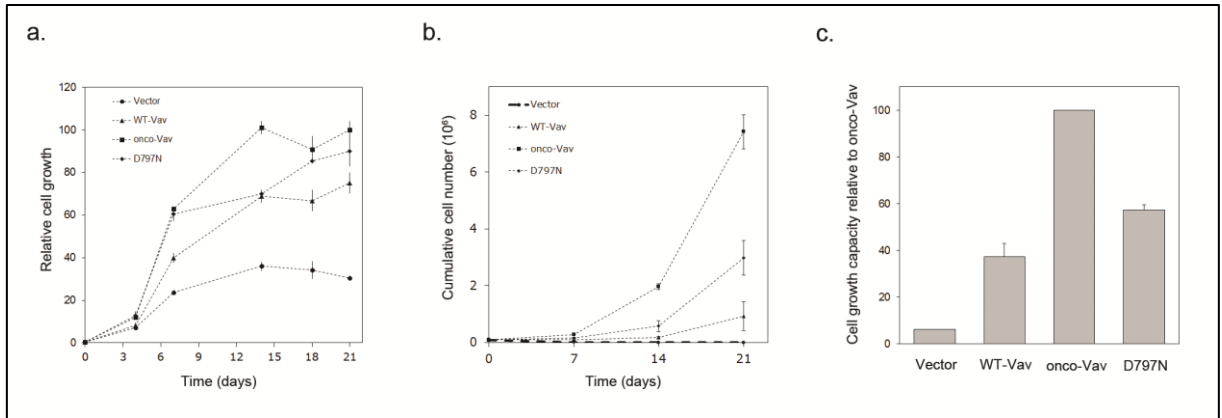
Figure 7: Razanadrakoto and al.



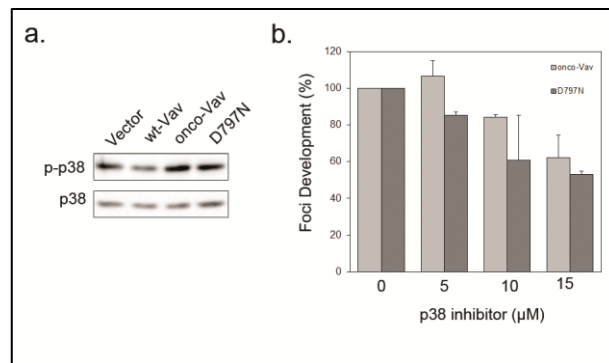
Supplementary Figure 1 : Razanadrakoto and al.



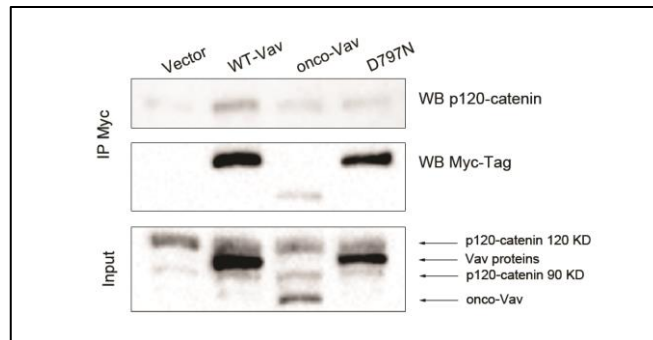
Supplementary Figure 2 : Razanadrakoto and al.



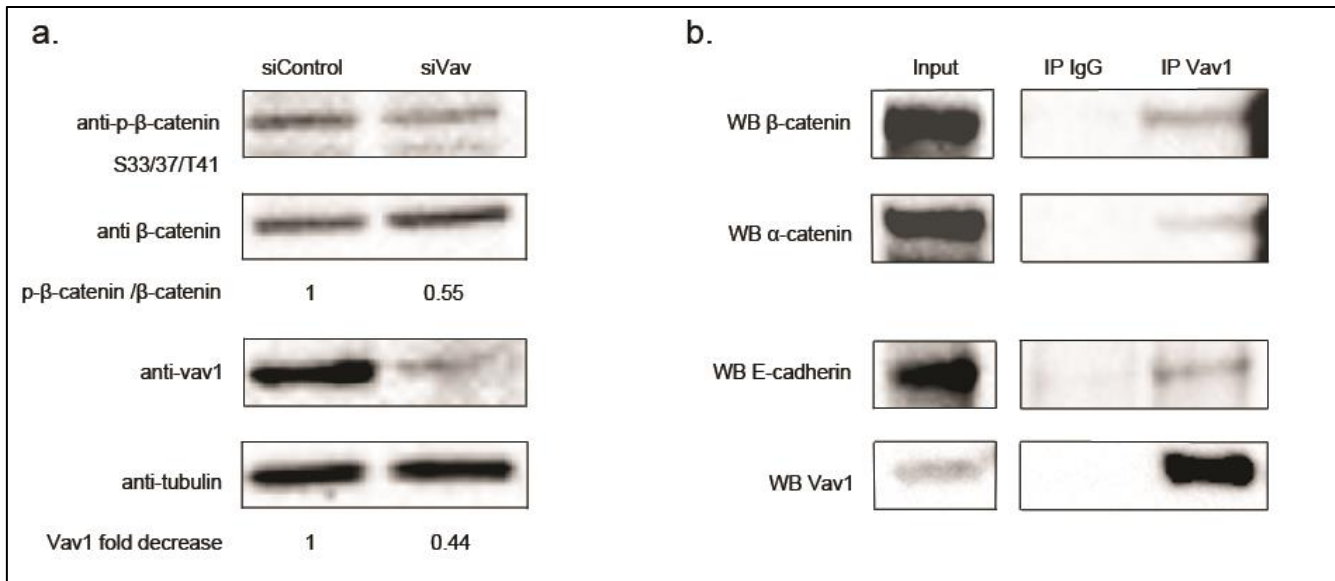
Supplementary Figure 3 : Razanadrakoto and al.



Supplementary Figure 4 : Razanadrakoto and al.



Supplementary Figure 5 : Razanadrakoto and al.



Résultats complémentaires

1 Activation de la kinase JNK au cours de la croissance des fibroblastes transformés

Au cours de cette étude, nous avons mis en évidence un rôle important de la kinase JNK comme intermédiaire dans la capacité du mutant D797N de Vav1 à former des foyers de cellules transformées. Afin de définir si l'activation de la JNK était continue au cours de la transformation ou si elle était régulée au cours de la prolifération cellulaire, nous avons réalisé une étude cinétique de l'activation de cette kinase sur les cellules formant des foyers, **Figure 30**. Le résultat montre que l'expression du mutant D797N, de même que onco-Vav, active de manière plus importante que le proto-oncogène la kinase JNK dès les premiers jours de culture (J6-J10) avec une intensité plus forte pour onco-Vav. Cette activation de JNK (analysée par la phosphorylation sur les résidus Thr183/Tyr 185) par les mutants transformants est très significative à J12. A J18, les cellules montrent des niveaux de phosphorylation de JNK comparables entre les différentes protéines Vav1 qui semblent correspondre à une saturation. Le niveau total d'expression de la kinase JNK quant à lui ne varie pas entre les différentes cultures ni au cours du temps. Ce résultat démontre que l'activation de JNK par les protéines Vav1 suit une cinétique variable au cours de la transformation.

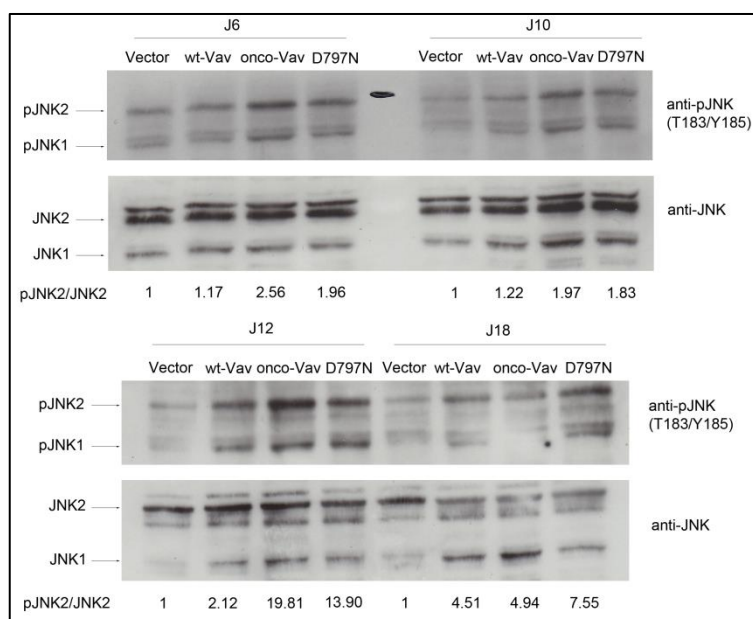


Figure 30 : Cinétique d'activation des kinases JNK1 et JNK2 dans les fibroblastes NIH3T3.

Les clones stables de cellules transfectées avec le vecteur seul ou exprimant, Vav1 ou les mutants transformants sontensemencées à 25000 cellules/puits dans une plaque de 6 puits. Le milieu de culture est renouvelé tous les deux jours sans passage des cellules. Aux temps indiqués, les cellules sont récoltées puis lysées. Les lysats totaux sont soumis à une immunoempreinte avec un anticorps dirigé contre les formes phosphorylées de JNK. La membrane est ensuite réhybridée

avec un anticorps anti-JNK total. La quantification de la bande correspondant à l'isoforme JNK2 est représentée.

Si l'on analyse comparativement la capacité proliférative de ces cellules transfectées de manière stable, on observe que les cellules exprimant les mutants transformants prolifèrent, aux premiers jours de culture, beaucoup plus vite que celles exprimant wt-Vav ou le vecteur seul, **Figure 31**. La courbe de prolifération de ces cellules s'infléchit après 12 jours de culture et semble atteindre une saturation après le 18^{ème} jour de cinétique. Les cellules exprimant wt-Vav progressent plus lentement et restent moins nombreuses même après 21 jours de culture. Les niveaux atteints par les cellules exprimant le vecteur seul restent beaucoup plus bas pour ces valeurs d'ensemencement initial. La prolifération des fibroblastes non transformés faiblit à partir du 15^{ème} jour de l'expérience. L'expression des protéines Vav1 et en particulier des mutants transformants confère donc une capacité proliférative plus importante aux fibroblastes. En considérant ces deux expériences, le profil d'activation de la kinase JNK par les protéines Vav1 est en accord avec la tendance des courbes de prolifération, montrant une activation et une prolifération maximale pour les cellules transformées dans les 10 premiers jours de culture et une activation retardée pour wt-Vav.

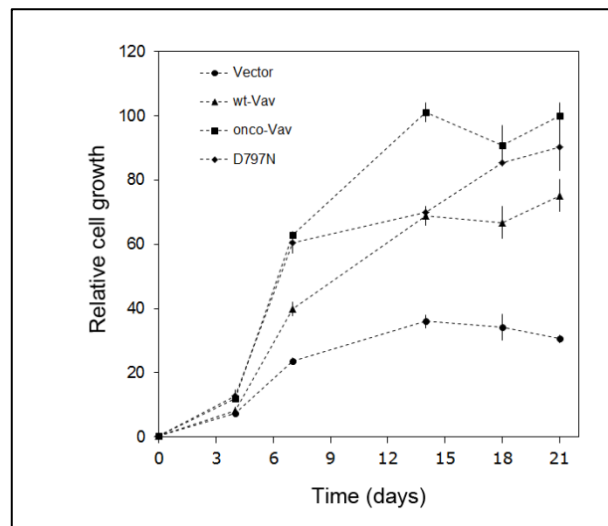


Figure 31 : Courbe de prolifération des fibroblastes NIH3T3.

Les cellules transfectées de manière stable avec le vecteur ou exprimant les différentes protéines Vav1 sont ensemencées à 25000 cellules/puits dans une plaque de 6 puits. Aux temps indiqués, les cellules sont récoltées puis comptées et réensemencées dans une plaque de 6 puits en présence de milieu de culture frais. Le graphe représente le pourcentage de croissance par rapport à onco-Vav (qui correspond à 100% de croissance).

2 Implication de Rac dans la phosphorylation de la β -caténine et répartition intracellulaire de cette forme phosphorylée

Nos analyses morphologiques ainsi que nos expériences de formation de foyers en présence de la forme dominant - négatif RacN17, ont démontré que Rac1 est un effecteur important de la transformation induite par le mutant D797N. JNK étant définie comme une cible activée en aval de Rac1, nous avons déterminé si Rac1 pouvait être un intermédiaire de la voie Vav1/JNK impliquée dans la phosphorylation de la β -caténine, **Figure 32**. Le résultat indique que l'expression de wt-Vav entraîne une légère augmentation de la phosphorylation de la β -caténine par rapport au niveau basal dans les fibroblastes avec le vecteur seul. Cette augmentation est plus marquée avec les mutants transformants. De même, l'expression de la forme constitutivement active RacL61 dans les fibroblastes conduit à une augmentation de la phosphorylation de la β -caténine. Ces observations révèlent que Rac1 participe à une signalisation pouvant mener à la phosphorylation de la β -caténine. Il semble donc que Rac1 soit un intermédiaire de la signalisation Vav1/JNK permettant la phosphorylation de la β -caténine.

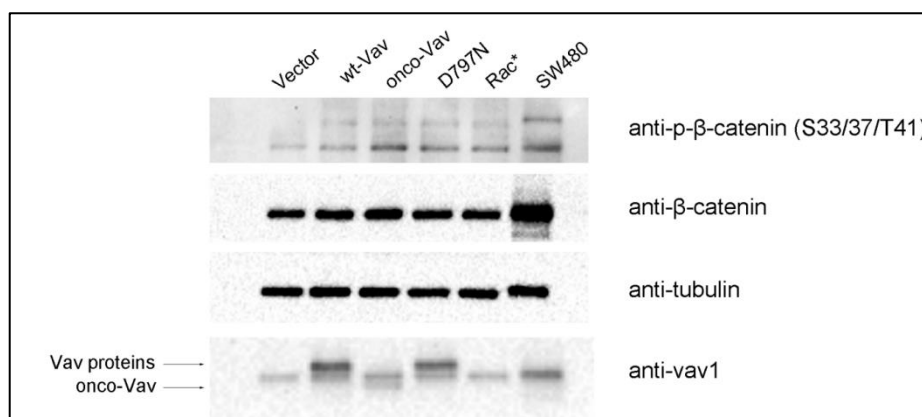


Figure 32 : Analyse de la phosphorylation de la β -caténine.

24h avant transfection, les cellules sontensemencées à 150000 cellules/puits dans une plaque de 6 puits. Elles sont ensuite transfectées avec 2 μ g de vecteur seul ou de plasmides codant les différentes protéines Vav1 à l'aide de la Lipofectamine (et Plus Reagent) selon le protocole recommandé par le fabricant (Invitrogen). Les lysats cellulaires (30 μ g) sont réalisés à 48h après transfection et sont soumis à une immunoempreinte avec l'anticorps anti-phospho- β -caténine. La membrane est ensuite réhybridée avec les différents anticorps de contrôle indiqués. Les cellules SW480 sont utilisées comme contrôle de l'expression de la β -caténine et de son activation.

Nous avons également réalisé l'analyse de la localisation subcellulaire de la β -caténine et de sa forme phosphorylée dans les fibroblastes, **Figure 33**. L'expression de la β -caténine de même que celle de la forme phosphorylée est majoritairement cytoplasmique. Une fraction de la protéine et de la forme phosphorylée est présente à la membrane et au noyau. La fraction nucléaire de β -caténine semble plus importante dans les cellules exprimant wt-Vav ou les mutants transformants. L'expression d'onco-Vav ou du mutant D797N conduit à une augmentation significative de la phosphorylation de la β -caténine dans le cytoplasme. En revanche, la proportion de la protéine nucléaire ou présente à la membrane phosphorylée sur les résidus S33/37/T41 ne semble pas varier entre les différents transfectants. La forme phosphorylée de la β -caténine est donc différenciellement répartie entre les différents compartiments intracellulaires et est prépondérante dans le cytoplasme.

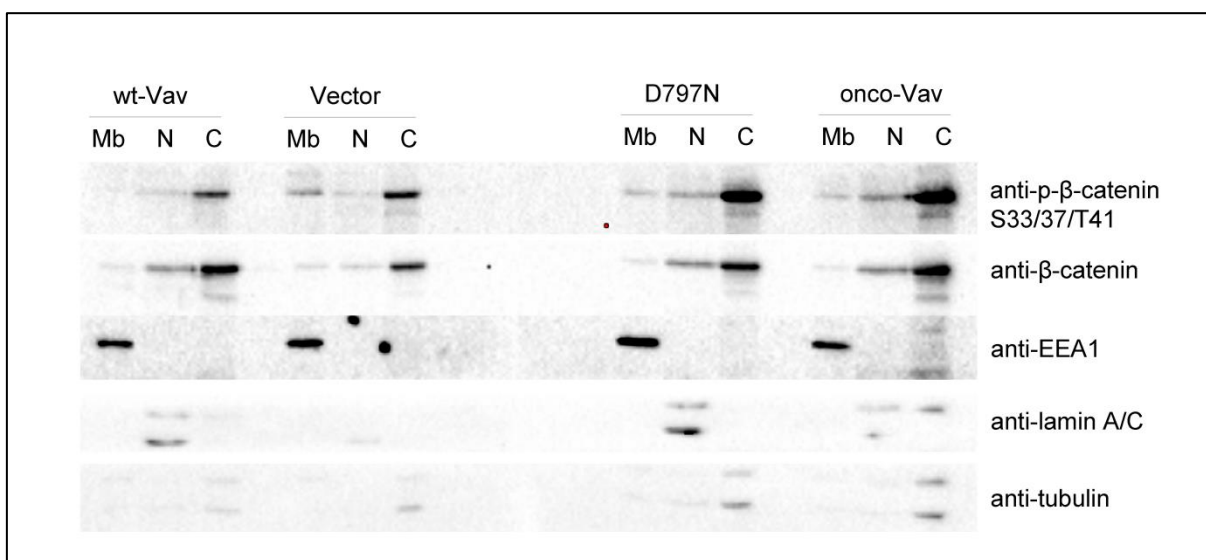


Figure 33 : Analyse de la répartition subcellulaire de la p β -caténine.

5.10^6 cellules, exprimant de manière stable les constructions de Vav1 ou le vecteur seul sont fractionnées entre fraction cytoplasmique (C), nucléaire (N) et membranaire (Mb) puis analysées par immunoempreinte avec les anticorps indiqués. Les protéines EEA1, Lamine A/C et Tubuline sont respectivement détectées pour garantir la pureté des fractions membranaire, nucléaire et cytoplasmique.

3 Activation transcriptionnelle dépendante des facteurs TCF

L'ensemble de nos résultats a identifié la β -caténine comme une nouvelle cible de la voie de signalisation Vav1/JNK importante pour la capacité transformante. La β -caténine joue un rôle à la fois dans les jonctions d'adhérence et dans les complexes des facteurs de transcription TCF/LEF.

Nous avons voulu analyser la conséquence de l'expression des protéines Vav1 sur la fonction transcriptionnelle de la β -caténine, **Figure 34**. L'expérience TOPFLASH est basée sur l'analyse d'un vecteur rapporteur luciférase placé sous le contrôle de sites de liaison du TCF. Nous avons observé une augmentation significative de l'activité luciférase dans les cellules exprimant les protéines Vav1. Cette augmentation est comparable dans les cellules exprimant wt-Vav ou le mutant D797N. Elle est beaucoup plus importante dans les cellules exprimant onco-Vav. Ce résultat démontre, qu'en absence de toute stimulation, l'expression des protéines Vav1 augmente l'activation transcriptionnelle dépendante des facteurs TCF dans les fibroblastes. Ceci suggère que les protéines Vav1 participeraient à la régulation par la β -caténine de la fonction transcriptionnelle des facteurs TCF.

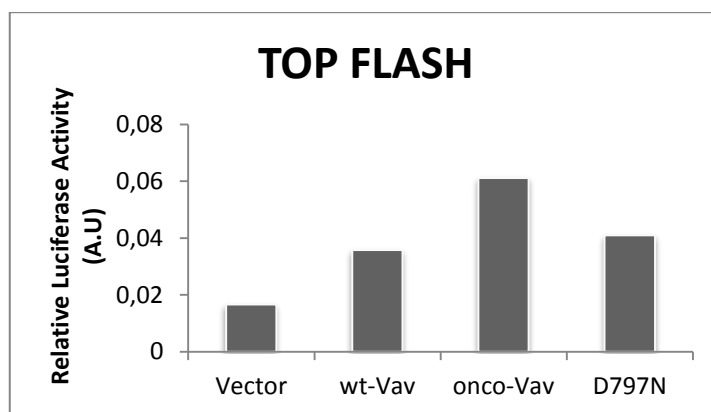


Figure 34 : Activation transcriptionnelle des promoteurs dépendant de TCF/LEF dans les cellules exprimant les protéines Vav1.

24h avant la transfection, 30000 cellules exprimant de manière stable les constructions indiquées sont ensemencées dans un puits d'une plaque de 12 puits. Les cellules sont transfectées avec 500ng de vecteur TOP contenant le gène rapporteur luciférase mis sous le contrôle d'un promoteur renfermant trois répétitions du motif de liaison pour les facteurs TCF/LEF. L'analyse de l'activité luciférase est réalisée 24h après transfection à l'aide du kit Dual Luciferase Promoter Assay (Promega) selon les recommandations du fabricant.

Dans ce contexte, nos résultats ont démontré que l'expression des protéines Vav1 dans les fibroblastes impacte l'expression de cibles transcriptionnelles de la β -caténine telles que l'*axine2* et *wnt9a*. Nous nous sommes donc intéressés à la possible modulation par Vav1 de l'expression de l'*axine2* dans le modèle pulmonaire H358. Aussi, nous avons analysé en PCR quantitative en temps réel, l'expression de l'ARN messager de l'*axine2* dans les cellules traitées avec des ARN interférents dirigés contre Vav1, **Figure 35**. Notre résultat préliminaire montre une légère

augmentation de l'expression de l'Axine2 dans les cellules traitées avec les ARN interférents dirigés contre Vav1, comparées aux cellules contrôles. La vérification des niveaux d'expression de l'ARNm de Vav1 dans les cellules traitées ou non, démontre qu'il y a bien une diminution de l'expression de Vav1 en réponse à l'utilisation des ARN interférents. Ainsi, ce résultat suggère que dans la lignée H358, l'expression de Vav1 pourrait également moduler l'expression de cible de la β -caténine telle que l'Axine2.

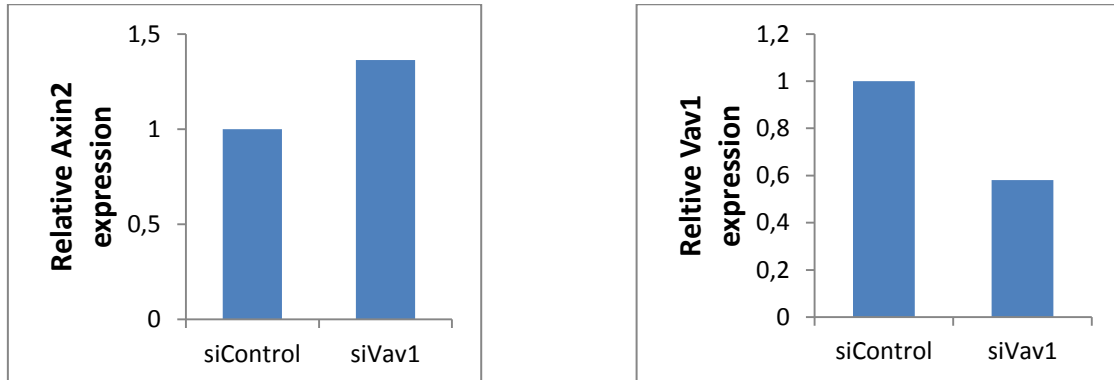


Figure 35 : Modulation par Vav1 de l'expression de l'axine2, cible spécifique de la β -caténine.

Les cellules H358 sont transfectées avec 50nM de siContrôle ou siVav1. 72h après transfection, les ARN totaux des cellules sont extraits à l'aide du TRIZOL (Invitrogen) et purifiés sur colonne (Quiagen). 1 μ g d'ARN est soumis à une transcription reverse (iScript DNA Synthesis Kit, Biorad). L'ADN complémentaire obtenu est analysé en PCR quantitative en utilisant des *primer* spécifiques de l'Axine2 et de Vav1. L'expression des gènes d'intérêt est analysée en temps réel à l'aide du SYBR Green (Applied Biosystem) et normalisée par rapport à l'expression du *gapdh* (Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase).

DISCUSSION

1 Domaine CSH3 et capacité transformante

L'objectif de mon doctorat a été de caractériser une éventuelle capacité transformante du proto-oncogène Vav1 qui ferait intervenir sa fonction adaptatrice. Pour cela, j'ai plus particulièrement analysé des mutants ponctuels du domaine CSH3 qui ont montré des capacités variables à altérer ou non la capacité transformante de l'oncogène. Les données de la littérature montrent qu'à l'inverse de la délétion de la région régulatrice « inhibitrice » N-terminale, la délétion de la région C-terminale, considérée comme « activatrice » des différentes fonctions de Vav1, n'active pas le potentiel transformant du proto-oncogène. Ainsi, la délétion totale des domaines NSH3-SH2-CSH3 n'active pas la capacité transformante du proto-oncogène Vav1 et ne modifie pas le pouvoir transformant d'onco-Vav (97). En revanche, des mutations ponctuelles de résidus importants dans le domaine SH2 ou SH3 influencent significativement la capacité transformante des formes tronquées onco-Vav et Vav Δ 1-186 (97, 154, 155). Les résultats démontrent que la mutation d'un seul résidu D797N spécifique au domaine CSH3 de Vav1 est capable d'activer la capacité transformante du proto-oncogène. Les mutations A789N et G830V qui concernent des résidus consensuels des domaines SH3 n'activent pas la capacité transformante de Vav1. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par Groysman *et al*, qui avait montré que la mutation D797N était la seule qui n'abolissait pas le pouvoir transformant d'onco-Vav, les mutations des résidus conservés A789N ou G830V conduisant à la perte de cette capacité transformante. C'est à partir des résultats de Groysman *et al*, que nous avons émis l'hypothèse que cette mutation du résidu spécifique D797N, indépendamment du contexte de la forme onco-Vav, pourrait activer la capacité transformante de Vav1. Mes résultats confirment cette hypothèse et valident ainsi l'existence d'une capacité transformante de Vav1 subordonnée à une conformation fonctionnelle des domaines adaptateurs.

D'autres travaux ont établi un rôle important des domaines SH3 dans la capacité transformante de différentes protéines de signalisation. Des mutations sur des résidus conservés dans le domaine SH3 de la protéine adaptatrice et oncogénique v-Crk (Avian Sarcoma Virus CT10 Oncogene Homolog) entraînent une diminution de sa capacité transformante (177). Au contraire, des mutations sur des résidus conservés des domaines SH3 dans les kinases Abl ou Src activent leur potentiel transformant (178-181). Mes analyses de la mutation D797N dans Vav1 associées à ces travaux sur les autres domaines SH3 mettent en avant le rôle régulateur des domaines adaptateurs sur la capacité transformante de certains proto-oncogènes.

L'absence de structure cristallographique de la protéine Vav1 entière rend difficile la prédiction exacte des conséquences des mutations introduites dans le domaine CSH3 sur la structure de Vav1 et sur les interactions intramoléculaires pouvant être modifiées. Toutefois, les

données de la littérature ont montré que la structure tridimensionnelle globale des domaines SH3 reste similaire même lorsque certains acides aminés sont différents. Le domaine CSH3 de Vav est très homologue à celui de l'adaptateur Grb2. Ainsi, le résidu A789 correspond au résidu A5 qui se situe dans le premier brin beta du domaine SH3 de Grb2. Le résidu G830 correspond au résidu G46 dans le 4^{ème} brin beta de Grb2. Ils sont situés dans les motifs de liaison de Grb2 avec ses ligands et font partie intégrante de la structure en feuillet beta du domaine SH3 (en page 40). Le résidu non conservé D797 spécifique à Vav se trouve dans la structure dans une position similaire aux résidus A13 ou D14 du domaine SH3 de Grb2, ces deux résidus ne sont pas impliqués dans la liaison à un ligand (155). Mes expériences réalisées avec la cycloheximide montrent que les mutations A789N et G830V entraînent une instabilité de Vav1 qui se manifeste par une demi-vie des protéines mutées beaucoup plus courte que celle de la forme sauvage ou du mutant D797N qui est de plus de 8h. Nous pouvons supposer que ces résidus conservés sont importants pour la conformation de la protéine et que les mutations introduites déstabilisent la structure de Vav1 en favorisant sa dégradation. A la différence, le mutant D797N pourrait contribuer à stabiliser Vav1 dans la cellule.

Dans ses travaux, l'équipe de C. Der avait émis l'hypothèse que les effets des mutations du domaine CSH3 sur le potentiel transformant de Vav1 viendraient de la régulation qu'il peut exercer sur les autres domaines (156). Dans mon cas, les essais de modélisation du domaine CSH3 de Vav1 avec la mutation D797N (résultats non montrés) indiquent que ce résidu est localisé dans une des boucles et non pas dans la structure en feuillet beta du domaine CSH3. La mutation n'affecte donc pas la structure du domaine CSH3 de Vav1. En revanche, ceci nous permet de suggérer que la modification par la mutation d'un résidu de la boucle pourrait altérer les interactions intramoléculaires entre les différents domaines de Vav1 et influencerait peut être l'affinité d'un de ces domaines pour ses ligands. Cette modification d'affinité ou d'interactions intramoléculaires permettrait sans doute une meilleure activation de Vav1 et des voies de signalisation qu'elle régule.

2 Implication de l'activité GEF dans la transformation

De nombreuses données de la littérature, comme j'ai déjà indiqué dans l'introduction, ont montré que la transformation associée aux GEF, comme par exemple Dbp, est liée le plus souvent à la dérégulation de leur fonction d'échange nucléotidique. Ainsi, la capacité transformante des formes tronquées de Vav1, a été en priorité associée à une activation constitutive de son activité d'échange sur les GTPases Rho (152, 174) Les importantes différences morphologiques observées entre les fibroblastes normaux ou exprimant wt-Vav et ceux

exprimant les mutants transformants, m'ont également conduit à explorer l'implication de la fonction GEF dans la transformation par le mutant D797N. Les expériences de formation de foyers en présence des dominants - négatifs RacN17 ou RhoN19 démontrent l'implication de la fonction GEF sur ces GTPases, dans la capacité transformante du mutant. Cependant, l'inhibition seulement partielle du développement des foyers en présence de ces dominants - négatifs indique que la capacité transformante n'est pas exclusivement dépendante de la fonction GEF. Ce résultat renforce mon hypothèse d'une contribution supplémentaire de la fonction adaptatrice dans la transformation.

Afin de définir les intermédiaires en aval des GTPases activés dans ce contexte, j'ai analysé les MAPK, JNK et p38, cibles des GTPases Rac/Rho. Les résultats démontrent une implication importante de l'activation de JNK dans la formation de foyers. En revanche, l'activation de p38 ne semble pas jouer un rôle clé dans la transformation. Cette différence entre p38 et JNK est en accord avec une activation de p38 majoritairement dépendante de la GTPase Ras. Nous savons que Vav1 ne prend part, que de manière indirecte, à l'activation de Ras, via des voies de signalisations synergiques (en page 37), faisant appel à une interaction de Vav1 avec d'autres adaptateurs dont Grb2 (56, 57). De plus, il a été décrit que p38 est un régulateur négatif du cycle cellulaire dans les fibroblastes et que la kinase avait ainsi un rôle anti-prolifératif peu propice à la transformation cellulaire (26). En ce qui concerne JNK, l'augmentation de l'activité de la kinase semble concomitante à l'activation de la prolifération cellulaire, plus rapide pour les mutants transformants. Ceci est particulièrement notable aux premiers jours de culture (6^{ème} au 12^{ème} jour) avant que la saturation de la culture ne ralentisse la progression cellulaire. Les pentes des courbes de prolifération sont alors très différentes. De plus, le niveau de saturation atteint par les cellules exprimant wt-Vav et plus encore le vecteur seul, est clairement plus faible que celui des mutants transformants. Ceci suggère que l'activité de la JNK, plus importante avec les mutants, impacte la capacité proliférative et que les cellules exprimant le vecteur seul ou Vav1 sauvage présente un arrêt de croissance à confluence tandis que les mutants transformants continuent de proliférer en perdant l'inhibition de contact. Ces résultats avec le mutant D797N sont consistants avec ceux obtenus avec la forme Vav Δ 1-186 dont la capacité transformante nécessite l'activité de la JNK (174).

3 Autres voies de signalisation impliquées dans la transformation

En plus de son rôle dans l'activation transcriptionnelle du facteur c-jun, il a été montré que la JNK est un régulateur important de l'adhésion des cellules épithéliales via son interaction avec la famille des caténines. L'équipe de M. Lee et coll. a impliqué JNK dans la phosphorylation

de la β -caténine sur les résidus S33/37/T41 et la diminution de l'adhésion cellulaire dans les cellules de kératinocytes (175). Cette équipe a ensuite mis en évidence, le rôle de JNK dans la modulation de l'association de l' α -caténine avec la β -caténine ; une étape nécessaire au transport du complexe vers la membrane (182). Au regard des modifications morphologiques et de l'activation importante de la JNK en présence des mutants transformants, j'ai évalué, dans les fibroblastes, la participation de JNK à la phosphorylation de la β -caténine. Les résultats montrent que l'expression ectopique de Vav1 dans ces cellules conduit déjà à une augmentation de la phosphorylation de la β -caténine sur les résidus S33/37/T41 mettant en avant une contribution de la voie Vav1/JNK dans la phosphorylation de la β -caténine, via probablement l'activité GEF de Vav1. Onco-Vav présente une activité GEF constitutive, ce qui explique l'augmentation plus importante de la phosphorylation de la β -caténine dans les cellules l'exprimant, par rapport à celles exprimant wt-Vav. De même, l'activation de JNK, plus importante dans les cellules exprimant le mutant D797N, est en accord avec l'augmentation de la phosphorylation de la β -caténine observée dans ces cellules. Les expériences réalisées avec un inhibiteur de JNK (SP600125) entraînent dans tous les cas une diminution de la phosphorylation de la β -caténine. Ceci confirme donc que, dans les fibroblastes, comme dans les kératinocytes, JNK prend part à la phosphorylation de la β -caténine. Ainsi, l'expression du facteur d'échange Vav1 ou de ses mutants activés qui peuvent moduler l'activation de JNK, entraîne aussi une augmentation de la phosphorylation de la β -caténine sur les résidus S33/37/T41.

Il faut noter que ces résidus sont aussi la cible des kinases CK1 et GSK3 β (en page 31). Ainsi, la β -caténine, dans les cellules épithéliales et dans les fibroblastes, est phosphorylable par la GSK3 β et par la JNK. La balance entre les activités de ces deux kinases reste à définir même si Lee *et al*, dans leurs travaux, suggèrent que la GSK3 β puisse être un substrat de JNK ; cette hypothèse n'a pas été testée directement (175). Dans la cellule, GSK3 β est une kinase activée constitutivement et la phosphorylation du résidu Y216 sert de marqueur de cette activation. La stimulation de la voie PI3K/PKB (Protein Kinase B) conduit à la phosphorylation de GSK3 β sur la S9 et à l'inhibition de son activité (183). Au cours de mes analyses, je n'ai pas mis en évidence une phosphorylation variable de GSK3 β pour les différentes protéines Vav1, ni sur le résidu Y216, ni sur le résidu S9 (résultats non montrés). Ainsi, distinguer la part de phosphorylation de la β -caténine par JNK, versus celle par GSK3 β , est difficile à réaliser dans mon système. L'hypothèse probable que l'on peut émettre est qu'il y aurait une compétition entre les deux kinases pour le pool cytoplasmique de β -caténine ou le pool minoritaire présent à la membrane.

4 Analyse de la voie d'activation JNK, β -caténine et Vav1

Comme déjà mentionné, l'équipe de Lee *et al*, a décrit dans les cellules épithéliales une interaction entre JNK et la β -caténine (175). Dans les fibroblastes NIH3T3 je n'ai pas retrouvé cette interaction entre la β -caténine et JNK (résultat non montré). Il est, cependant, important de noter que j'ai réalisé les expériences avec les protéines endogènes alors que celles rapportées dans les cellules épithéliales 293T étaient basées sur un système de surexpression avec des constructions JNK portant une étiquette FLAG. Une interaction transitoire ou minoritaire a pu être difficile à caractériser dans mes conditions. En revanche, j'ai mis en évidence une interaction des protéines Vav1 avec la β -caténine et celle-ci a pu être confirmée par des expériences de *GST pull down*. Le résultat avec la protéine de fusion GST implique le domaine adaptateur dans le recrutement de la β -caténine, notamment via le domaine SH2. Ce résultat est cohérent avec mon analyse de la séquence en acide aminé de la β -caténine qui ne présente pas de motifs Proline consensus reconnaissables par les domaines SH3. Cependant, la β -caténine possède de nombreux résidus Tyrosine consensus phosphorylables qui peuvent être reconnus par le domaine SH2 de Vav1 (30), **Figure 36**.



SITES	ENZYME	FONCTION
Y654	Src	Signalisation, diminution de la liaison à la cadhérine
Y142	Fer/Fyn ; Met	Signalisation, diminution de la liaison à l' α -caténine
Y86, Y654	Bcr-Abl ; Abl	Signalisation, stabilisation de la β -caténine
Y333	Src (via EGFR)	Signalisation, potentialise la fonction nucléaire en réponse à l'EGF (indépendamment de Wnt)
Y489	Abl	Signalisation, empêche la liaison à la N-cadhérine.
Y654, Y670	Met	Signalisation, libération de la membrane en réponse à l'HGF

Figure 36 : Rôles des résidus tyrosine de la β -caténine.

En haut, un schéma de la structure de la β -caténine avec un rappel des importants sites de phosphorylation. En bas, un tableau récapitulatif de la localisation et la fonction associée aux résidus tyrosine phosphorylés de la β -caténine (d'après Valenta *et al*, 2012).

Le plus souvent, la phosphorylation de ces résidus conduit à la réduction de l'interaction de la β -caténine avec les constituants du complexe d'adhésion et à l'activation de sa fonction de signalisation, notamment dans le noyau (184). C'est le cas, par exemple, de la Tyrosine en position 654 qui est ciblée à la fois par des récepteurs (comme EGFR, MET) et par des kinases (comme Src ou Abl) (184), **Figure 36**. L'interaction à la fois de wt-Vav mais aussi de D797N avec la β -caténine montre bien que la mutation effectuée, positionnée dans une boucle du domaine et pas dans une région de reconnaissance des résidus proline, n'affecte pas cette liaison. Bien évidemment, ces expériences de GST n'éliminent pas la possibilité que d'autres domaines de Vav1 puissent participer à l'interaction avec la β -caténine.

Dans les fibroblastes normaux, la β -caténine est localisée majoritairement au niveau des jonctions cellulaires dans les lamellipodes des cellules en contact. On trouve peu de β -caténine dans les zones où il n'y a pas de contact cellulaire. En revanche, lors de la transformation cellulaire par l'oncogène Ras, par exemple, il y a une augmentation du pool membranaire avec une relocalisation de la β -caténine, ainsi qu'une augmentation du pool cytoplasmique (32). Mes analyses en immunofluorescence montrent que les mutants oncogéniques de Vav1 induisent également une augmentation et une relocalisation de la β -caténine à la membrane et dans le cytoplasme. L'analyse par immunoempreinte montre que le niveau de β -caténine totale reste inchangé dans les cellules exprimant Vav1 ou les mutants oncogéniques, comparées aux cellules avec le vecteur seulement. Il semblerait donc que la phosphorylation par JNK ne soit pas associée à une dégradation de la β -caténine, comme c'est le cas avec la kinase GSK3 β . Mon hypothèse actuelle est que la phosphorylation par la JNK dans mon contexte ne soit pas liée au recrutement de la β -caténine par le complexe de dégradation par l'ubiquitination. En fait, il a été établi que la fixation de la GSK3 β sur la β -caténine, nécessitait une phosphorylation préalable par la CK1 sur le résidu T41. La phosphorylation par la JNK se faisant directement sur les résidus S33/T41, il est envisageable que celle-ci empêche alors la fixation de CK1, de GSK3 β puis de l'adaptateur APC. Il a également été décrit que la β -caténine pouvait être dirigée directement vers le système de l'ubiquitination et du protéasome sans l'intervention de GSK3 β (185). L'interaction des protéines Vav1 avec la β -caténine pourrait plutôt interférer directement avec l'adressage de la β -caténine au protéasome et l'excédent de phospho β -caténine généré par JNK pourrait également supplémentairement interférer dans l'adressage. En conséquence, la β -caténine ne pourrait plus être dégradée et serait stabilisée dans le cytoplasme et à la membrane.

Plusieurs arguments de la littérature viennent renforcer mes observations sur la relocalisation de la β -caténine à la membrane dans les fibroblastes. Les travaux de l'équipe de A. Burgess ont mis en évidence qu'il existe un pool de phospho β -caténine complexé avec

l'adaptateur APC présent au front de migration et dans les protrusions des cellules épithéliales MDCK (186). Par ailleurs, il a été montré qu'il y a également un complexe APC/ GSK3 β / phospho β -caténine présent dans les contacts cellulaires; ce complexe est différent du complexe jonctionnel impliquant la cadhérine (187). Nous savons que Vav1 et la JNK peuvent être adressées à la membrane en réponse à une stimulation. Nous pouvons donc faire l'hypothèse qu'une fraction de β -caténine et de phospho β -caténine soit adressée à la membrane de manière Vav1/JNK dépendante et qu'elle y soit alors stabilisée. Les résultats de fractionnement cellulaire vont dans ce sens car on retrouve une fraction de la β -caténine phosphorylée à la fois dans le cytoplasme mais aussi à la membrane.

5 La β -caténine est une nouvelle cible fonctionnelle de Vav1 au niveau des jonctions d'adhésion

Les données dans les fibroblastes me permettent de proposer un modèle associé à la transformation cellulaire, basé sur l'activation par Vav1 de la voie Rac/JNK qui conduit au remodelage du cytosquelette, à la phosphorylation et à la relocalisation de la β -caténine à la membrane. Ce modèle fibroblastique est confirmé par les résultats dans les lignées humaines de cancer de poumons H358 et H441. Dans les cellules H358, mes expériences d'immunofluorescence indiquent la co-localisation de Vav1, non seulement avec la β -caténine, mais aussi avec certains constituants du complexe d'adhésion. Ces résultats et les expériences d'immunoprécipitations dans les deux lignées, montrant une interaction de Vav1 avec l' α -caténine et l'E-cadhérine mettent en évidence la participation de Vav1 au complexe d'adhésion dans un modèle physiopathologique exprimant la protéine Vav1. Ainsi, Vav1 aurait un rôle dans la modulation de la fonction de la β -caténine au sein des complexes d'adhésion à la membrane dans les cellules cancéreuses pulmonaires. Vav1 n'est pas le seul facteur d'échange décrit pour moduler les jonctions cellulaires dans les cellules transformées. Le GEF Tuba qui est spécifique de la GTPase Cdc42 est impliqué dans la modulation des contacts cellulaires. La déplétion de Tuba dans les cellules épithéliales de cancer colorectal Caco-2 perturbe les jonctions d'adhérence (188). Ect2, un autre GEF qui cible RhoA, Rac1 et Cdc42 est connu pour interagir avec le complexe de l'E-cadhérine et avec l'actine. La déplétion d'Ect2 dans les cellules MDCK ou les cellules MCF7 n'empêche pas l'assemblage des jonctions mais, par contre, elle perturbe la distribution latérale membranaire de l'E-cadhérine et influence ainsi l'adhésion (188).

Ainsi, les divers GEF, dont Vav1, modulent de différentes manières les jonctions d'adhérence et peuvent, selon le contexte cellulaire, influencer la maturation et le renforcement de ces jonctions ou au contraire induire leur déstabilisation.

6 Mise en évidence de l'implication de Vav1 dans la fonction transcriptionnelle de la β -caténine

Les résultats d'immunofluorescence dans les fibroblastes montrent une relocalisation de la β -caténine dans la zone péri-nucléaire en présence des mutants de Vav1 et une légère augmentation de sa présence dans le noyau. Des augmentations similaires de la présence de β -caténine dans le noyau sont mises en évidence lors de l'expression d'une forme constitutivement active de Rac dans les cellules HCT116 de cancer du côlon (189). Vav1 semble donc pouvoir influencer à la fois l'adressage membranaire de la β -caténine mais également son transfert et/ou son activité dans le noyau. La protéine Vav1 est majoritairement retrouvée dans le cytoplasme mais, en fonction du type cellulaire, également présente en quantités variables dans le compartiment nucléaire. J'ai donc recherché l'influence des mutants transformants sur l'activité nucléaire transcriptionnelle de la β -caténine. Mon analyse de l'*axine2*, une cible transcriptionnelle spécifique de la voie Wnt/ β -caténine, passant par les facteurs TCF/LEF, montre une diminution de l'ARNm codant l'Axine2 en présence des protéines Vav1. Ceci reflète probablement une diminution de l'activité transcriptionnelle de la β -caténine sur cette cible en présence de Vav1. Un résultat similaire a été décrit dans des lymphocytes T primaires humains, stimulés à l'aide de CD3/CD28 (190). Cette stimulation entraîne une stabilisation de la β -caténine, son accumulation dans le noyau mais une diminution de la transcription des cibles spécifiques *axin2* et *DKK1* (Dickkopf-related protein 1). Ces données pointent vers un rôle régulateur négatif de Vav1 sur la transcription de certains gènes cibles de la voie Wnt/ β -caténine.

Il a été récemment suggéré que la β -caténine puisse avoir d'autres fonctions transcriptionnelles que celles associées à Wnt (191). Mes résultats suggèrent fortement que Vav1 soit un acteur de la modulation de ces fonctions transcriptionnelles nouvellement révélées de la β -caténine. Dans ce sens, nous montrons que les protéines Vav1, et notamment les formes transformantes, via JNK, conduisent à la phosphorylation de c-jun et à une augmentation de l'activité transcriptionnelle du facteur AP1. Plusieurs études ont mis en évidence que les facteurs de transcription AP1 et TCF co-régulent la transcription de certains gènes (189, 192). Notre hypothèse actuelle serait ainsi que l'expression des protéines Vav1 augmenterait l'activation des gènes co-régulés par AP1 et TCF au détriment de ceux sous l'unique modulation par TCF, d'où une augmentation retrouvée dans nos expériences de PCR quantitative, des messagers de certains gènes co-régulés par ces facteurs comme *wnt9a*.

Mes résultats obtenus avec les vecteurs rapporteurs luciférase TOPFLASH sur l'activité transcriptionnelle de la β -caténine en présence de Vav1 sont, à ce niveau, contradictoires. Dans ces expériences, je trouve une augmentation de l'activité transcriptionnelle, sous le contrôle de

sites TCF, en présence de Vav1 et de manière plus importante en présence d'onco-Vav ou de D797N, ce qui est contraire à la diminution de la transcription de *l'axin2* observée. Ce vecteur porte trois sites de liaison du TCF, il ne reproduit donc pas le promoteur endogène de *l'Axine 2* et l'expression de Vav1 dans ces cellules peut modifier la balance entre les facteurs de transcription capables de se fixer sur le vecteur rapporteur, indépendamment de l'activation liée à la voie Vav1/Rac/JNK/ β -caténine. En outre, il a été établi que la forme active de la β -caténine décrite est celle qui est peu ou pas phosphorylée sur les résidus S33/37/T41 (193). La forme phosphorylée sur S33/37/T41 n'est pas capable de former un complexe ternaire avec l'ADN, malgré son interaction avec le facteur LEF ; ceci souligne que cette forme phosphorylée n'a pas d'activité transcriptionnelle (194). D'autres travaux ont aussi montré que malgré la délétion conditionnelle du gène codant la β -caténine dans les cellules souches hématopoïétiques, il restait toujours une activité du vecteur rapporteur luciférase sous le contrôle du TCF. Ces données indiquent l'existence d'un facteur additionnel impliqué dans la transcription associée à TCF, autre que la β -caténine (195).

Les résultats préliminaires basés sur l'utilisation d'ARN interférents dirigés contre Vav1 l'impliquent aussi dans la modulation de la transcription de *l'Axine2*, cible de la β -caténine, dans les cellules H358. La légère augmentation de l'expression de *l'Axine2* obtenue dans les cellules traitées avec l'ARN interférent de Vav1 est en accord avec la diminution observée dans les fibroblastes. La différence d'intensité des réponses, observée dans les deux systèmes cellulaire, peut s'expliquer par le niveau d'expression différentiel de *l'Axine2* dans ces deux lignées. En effet, *l'Axine2*, ainsi que les partenaires fonctionnels de la β -caténine (tels que l'E-cadhérine, l' α -caténine ou la p120-caténine), sont abondamment exprimés dans les cellules épithéliales H358 comparées aux fibroblastes NIH3T3. Aussi, la diminution transitoire de l'expression de Vav1 dans la lignée H358 n'aurait qu'une influence mineure sur le pool abondant d'*l'Axine2* exprimé dans cette lignée. En revanche, l'expression stable des protéines Vav1 dans les fibroblastes impacterait significativement le pool minoritaire d'*l'Axine2* exprimée dans ces cellules.

Vav1 aurait donc un rôle dans la modulation de la fonction de la β -caténine, à la fois dans les complexes d'adhésion à la membrane, mais sans doute aussi dans les complexes d'activation transcriptionnelle dans le noyau, dans les cellules cancéreuses pulmonaires. Aux vues de l'ensemble de ces informations, Vav1 pourrait jouer un rôle d'adaptateur nucléaire ou de co-facteur et coopérer avec la β -caténine dans les complexes transcriptionnels du TCF indépendamment de la voie Wnt.

7 Implication de la régulation de la β -caténine par Vav1 dans le cancer

Nous avons vu dans l'introduction que Vav2 et Vav3 agissent en synergie pour promouvoir la néoangiogenèse et la progression métastatique (en page 69). L'expression de Vav1 dans les cellules de cancer du poumon et dans le cancer du pancréas, est liée à une plus forte agressivité des tumeurs (168, 169). Tous ces processus nécessitent un remaniement du cytosquelette et une modulation de l'adhésion cellulaire. Lors de la néoangiogenèse, les cellules doivent adhérer entre elles pour former le vaisseau sanguin. Lors de la progression métastatique les cellules doivent se détacher pour migrer. Le modèle que je propose de la régulation par Vav1 des fonctions de la β -caténine dans les jonctions et au noyau, appuie vraisemblablement l'activité pro-tumorigénique décrite pour les protéines Vav.

Nous pouvons envisager que la participation de Vav1 dans les complexes jonctionnelles ne se restreint pas aux fibroblastes et aux cellules de cancer du poumon, mais pourrait être un mécanisme commun aux cellules cancéreuses qui expriment ectopiquement Vav1. De même, la capacité potentielle de Vav1 à moduler des programmes transcriptionnels en relation avec la β -caténine, nous permet d'appréhender un possible rôle nucléaire de Vav1 dans les lignées cancéreuses, comme décrit pour Vav3 dans le cancer de la prostate (162).

L'étude des fonctions physiologiques de Vav1 dans les cellules hématopoïétiques a mené à la distinction des fonctions liées à l'activité GEF (réorganisation du cytosquelette, activation transcriptionnelle et activation des intégrines) de celles liées à l'activité adaptatrice (régulation du flux calcique, activation de la kinase ERK1...) (196). Je mets en avant un modèle où la transformation cellulaire associée à Vav1 dans les cellules non hématopoïétiques nécessite à la fois sa fonction GEF et sa fonction adaptatrice. Cette fonction adaptatrice est impliquée dans le recrutement de partenaires membranaires et cytoplasmiques qui sont essentiels pour la transformation, mais également dans la participation de Vav1 aux complexes d'activation transcriptionnelle de gènes qui vont promouvoir la prolifération et la survie des cellules cancéreuses.

Dans les cellules cancéreuses humaines qui expriment ectopiquement Vav1, cette dernière pourrait être une cible thérapeutique intéressante afin de freiner la progression de la pathologie et améliorer les chances de survie des patients. En effet, on peut essayer de cibler spécifiquement, dans les cas de cancer du poumon, l'interaction de Vav1 avec les composants des jonctions d'adhérence. Ceci contribuerait à ralentir le développement tumoral. Toutefois, Vav1 n'est sans doute pas le seul GEF exprimé dans ces cellules cancéreuses et les autres GEF peuvent avoir des rôles déterminants voire compensatoires. En outre, Vav2 et Vav3 sont également

présents dans ces cellules et pourraient jouer eux aussi un rôle compensatoire. Aussi, des études plus poussées sont-elles nécessaires avant d'envisager une stratégie thérapeutique impliquant Vav1.

CONCLUSIONS

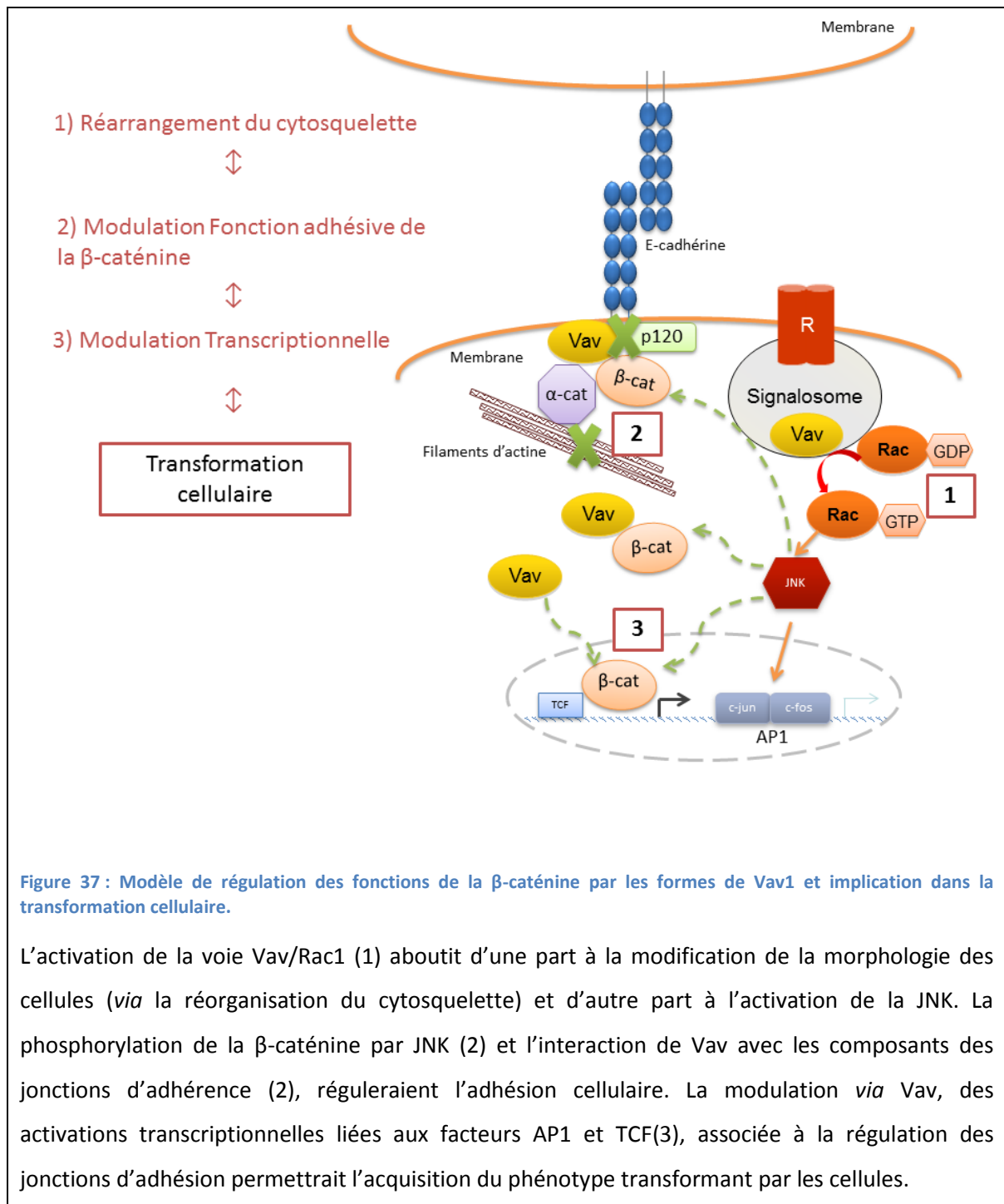
J'ai mis en évidence, dans la première partie de cette étude, une mutation ponctuelle sur un résidu spécifique du domaine CSH3 de Vav1 capable d'activer le potentiel transformant du proto-oncogène. L'approche par utilisation de mutants ponctuels a permis de dégager le rôle des domaines adaptateurs de Vav1 et notamment du domaine CSH3 dans la modulation de ses fonctions. Il est à présent évident, qu'au-delà de la perte des domaines N-terminaux régulateurs, des modifications plus subtiles, introduites dans les domaines adaptateurs, peuvent contribuer à la dérégulation de l'activité d'échange et à l'acquisition de la capacité transformante.

L'étude de ce mutant D797N m'a conduite dans la seconde partie de ce travail, à la caractérisation d'un nouveau partenaire fonctionnel de Vav1 et à la découverte de nouvelles voies de signalisation régulées par le proto-oncogène. Ainsi, outre la voie classique Rac/JNK/AP1, il apparaît que les protéines Vav1 stimulent une voie additionnelle de la kinase JNK ciblant la β -caténine. L'expression de Vav1 et en particulier des mutants transformants onco-Vav et D797N conduit à une phosphorylation non dégradative de la β -caténine sur les résidus S33/37/T41 par JNK et à la stabilisation de cette forme phosphorylée dans le cytoplasme. Il serait intéressant à ce propos, de déterminer le devenir de cette forme phosphorylée de la β -caténine. Les fibroblastes pourraient être traités pendant différents temps avec la cycloheximide (un inhibiteur de la synthèse protéique *de novo*), ce qui nous donnera une indication de la demi-vie de la phospho- β -caténine et par là même celle de la β -caténine dans ces cellules.

J'ai aussi observé une interaction de la β -caténine avec les différentes formes de Vav1 associée à une redistribution de la β -caténine le long de la membrane cellulaire dans les fibroblastes. Ces données mènent à la conclusion que la phosphorylation par JNK de la β -caténine et l'interaction de cette dernière avec Vav1 peut moduler les fonctions de la β -caténine dans les jonctions d'adhérence. Mes analyses dans les cellules humaines de cancer du poumon appuient ce rôle potentiel de Vav1 dans la modulation de la fonction adhésive de la β -caténine. J'ai également mis en évidence la capacité de Vav1 et de ses mutants à moduler l'activité transcriptionnelle de la β -caténine, indépendamment de la voie Wnt dans les fibroblastes. Mes résultats préliminaires suggèrent que ce serait également le cas dans la lignée H358. Ceci est en faveur de la participation de Vav1 aux complexes transcriptionnels régulés par la β -caténine et pouvant contenir les facteurs TCF et/ou AP1.

Nous pouvons déduire de l'ensemble des analyses effectuées, un modèle mécanistique dans lequel le remaniement du cytosquelette (via Rac) associé à la modulation des jonctions d'adhérence (via la β -caténine) par Vav1 et ses mutants, participerait à la perte de l'inhibition de contact contribuant ainsi à l'acquisition du phénotype transformant. En outre, les protéines Vav1

pourraient moduler des programmes transcriptionnels favorisant la transformation cellulaire grâce à la régulation des fonctions transcriptionnelles de la β -caténine et l'activation des facteurs AP1 et TCF, **Figure 37**.



Afin de corroborer ce rôle de Vav1 dans la modulation des fonctions de la β -caténine, nous pourrions envisager :

- Des expériences de co-immunoprécipitations de Vav1 avec les composants du complexe de dégradation de la β -caténine tels APC, les CK1 et GSK3 dans les lignées de cancer du poumon. Ceci permettra de déterminer la participation éventuelle de Vav1 à ce complexe et ainsi étayer son impact sur la stabilisation de la β -caténine.
- Des expériences de déplétion en calcium ou de traitement mécanique des cellules de cancer du poumon transfectées ou non avec un ARN interférent dirigé contre Vav1. Ces approches seraient utilisées pour déstabiliser les jonctions d'adhérences et contribueraient donc à confirmer l'implication de Vav1 dans la régulation de l'adhésion cellulaire.
- Des expériences d'immunoprécipitation de la chromatine dans les lignées de cancer du poumon ; ceci contribuerait à valider la participation de Vav1 aux complexes transcriptionnels impliquant la β -caténine.

Au final, ce travail a mis en exergue que des altérations dans les domaines fonctionnels du proto-oncogène Vav1 ou son expression ectopique dans des lignages non hématopoïétiques, lui permettent d'activer des voies de signalisations qui favorisent la transformation cellulaire. De par son double rôle de facteur d'échange et d'adaptateur, Vav1 est au carrefour de nombreuses voies d'activation cellulaire que la cellule transformée pourrait mettre à profit pour activer les processus tumorigéniques et métastatiques.

Bibliographie

1. Hall, A. (1998) Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science* **279**, 509-514
2. Buday, L., and Downward, J. (2008) Many faces of Ras activation. *Biochimica et biophysica acta* **1786**, 178-187
3. Bustelo, X. R., Sauzeau, V., and Berenjeno, I. M. (2007) GTP-binding proteins of the Rho/Rac family: regulation, effectors and functions in vivo. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* **29**, 356-370
4. Rojas, A. M., Fuentes, G., Rausell, A., and Valencia, A. (2012) The Ras protein superfamily: evolutionary tree and role of conserved amino acids. *The Journal of cell biology* **196**, 189-201
5. Paduch, M., Jelen, F., and Otlewski, J. (2001) Structure of small G proteins and their regulators. *Acta biochimica Polonica* **48**, 829-850
6. Ligeti, E., Welti, S., and Scheffzek, K. (2012) Inhibition and termination of physiological responses by GTPase activating proteins. *Physiological reviews* **92**, 237-272
7. Cherfils, J., and Zeghouf, M. (2013) Regulation of small GTPases by GEFs, GAPs, and GDIs. *Physiological reviews* **93**, 269-309
8. Nobes, C. D., and Hall, A. (1999) Rho GTPases control polarity, protrusion, and adhesion during cell movement. *The Journal of cell biology* **144**, 1235-1244
9. Takai, Y., Sasaki, T., and Matozaki, T. (2001) Small GTP-binding proteins. *Physiological reviews* **81**, 153-208
10. Bar-Sagi, D., and Hall, A. (2000) Ras and Rho GTPases: a family reunion. *Cell* **103**, 227-238
11. Jaffe, A. B., and Hall, A. (2005) Rho GTPases: biochemistry and biology. *Annual review of cell and developmental biology* **21**, 247-269
12. Hall, A. (2012) Rho family GTPases. *Biochemical Society transactions* **40**, 1378-1382
13. Malliri, A., and Collard, J. G. (2003) Role of Rho-family proteins in cell adhesion and cancer. *Current opinion in cell biology* **15**, 583-589
14. Mack, N. A., Whalley, H. J., Castillo-Lluva, S., and Malliri, A. (2011) The diverse roles of Rac signaling in tumorigenesis. *Cell Cycle* **10**, 1571-1581
15. Lazer, G., Pe'er, L., Farago, M., Machida, K., Mayer, B. J., and Katzav, S. (2010) Tyrosine residues at the carboxyl terminus of Vav1 play an important role in regulation of its biological activity. *The Journal of biological chemistry* **285**, 23075-23085
16. Parri, M., and Chiarugi, P. (2010) Rac and Rho GTPases in cancer cell motility control. *Cell communication and signaling : CCS* **8**, 23
17. Hartsock, A., and Nelson, W. J. (2008) Adherens and tight junctions: structure, function and connections to the actin cytoskeleton. *Biochimica et biophysica acta* **1778**, 660-669
18. Shapiro, L., and Weis, W. I. (2009) Structure and biochemistry of cadherins and catenins. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* **1**, a003053
19. Daugherty, R. L., and Gottardi, C. J. (2007) Phospho-regulation of Beta-catenin adhesion and signaling functions. *Physiology (Bethesda)* **22**, 303-309
20. Delva, E., and Kowalczyk, A. P. (2009) Regulation of cadherin trafficking. *Traffic* **10**, 259-267
21. Citi, S., Spadaro, D., Schneider, Y., Stutz, J., and Pulimeno, P. (2011) Regulation of small GTPases at epithelial cell-cell junctions. *Molecular membrane biology* **28**, 427-444
22. Fukata, M., and Kaibuchi, K. (2001) Rho-family GTPases in cadherin-mediated cell-cell adhesion. *Nature reviews. Molecular cell biology* **2**, 887-897
23. Menke, A., and Giehl, K. (2012) Regulation of adherens junctions by Rho GTPases and p120-catenin. *Archives of biochemistry and biophysics* **524**, 48-55
24. Watanabe, T., Sato, K., and Kaibuchi, K. (2009) Cadherin-mediated intercellular adhesion and signaling cascades involving small GTPases. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* **1**, a003020
25. Popoff, M. R., and Geny, B. (2009) Multifaceted role of Rho, Rac, Cdc42 and Ras in intercellular junctions, lessons from toxins. *Biochimica et biophysica acta* **1788**, 797-812

26. Wagner, E. F., and Nebreda, A. R. (2009) Signal integration by JNK and p38 MAPK pathways in cancer development. *Nature reviews. Cancer* **9**, 537-549
27. Saadeddin, A., Babaei-Jadidi, R., Spencer-Dene, B., and Nateri, A. S. (2009) The links between transcription, beta-catenin/JNK signaling, and carcinogenesis. *Molecular cancer research : MCR* **7**, 1189-1196
28. Fuchs, S. Y., Dolan, L., Davis, R. J., and Ronai, Z. (1996) Phosphorylation-dependent targeting of c-Jun ubiquitination by Jun N-kinase. *Oncogene* **13**, 1531-1535
29. Khatlani, T. S., Wislez, M., Sun, M., Srinivas, H., Iwanaga, K., Ma, L., Hanna, A. E., Liu, D., Girard, L., Kim, Y. H., Pollack, J. R., Minna, J. D., Wistuba, II, and Kurie, J. M. (2007) c-Jun N-terminal kinase is activated in non-small-cell lung cancer and promotes neoplastic transformation in human bronchial epithelial cells. *Oncogene* **26**, 2658-2666
30. Verheyen, E. M., and Gottardi, C. J. (2010) Regulation of Wnt/beta-catenin signaling by protein kinases. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* **239**, 34-44
31. Xu, W., and Kimelman, D. (2007) Mechanistic insights from structural studies of beta-catenin and its binding partners. *Journal of cell science* **120**, 3337-3344
32. Gloushankova, N. A. (2008) Changes in regulation of cell-cell adhesion during tumor transformation. *Biochemistry. Biokhimiia* **73**, 742-750
33. Grossmann, T. N., Yeh, J. T., Bowman, B. R., Chu, Q., Moellering, R. E., and Verdine, G. L. (2012) Inhibition of oncogenic Wnt signaling through direct targeting of beta-catenin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **109**, 17942-17947
34. Bustelo, X. R. (2000) Regulatory and signaling properties of the Vav family. *Molecular and cellular biology* **20**, 1461-1477
35. Katzav, S., Martin-Zanca, D., and Barbacid, M. (1989) vav, a novel human oncogene derived from a locus ubiquitously expressed in hematopoietic cells. *The EMBO journal* **8**, 2283-2290
36. Henske, E. P., Short, M. P., Jozwiak, S., Bovey, C. M., Ramlakhan, S., Haines, J. L., and Kwiatkowski, D. J. (1995) Identification of VAV2 on 9q34 and its exclusion as the tuberous sclerosis gene TSC1. *Annals of human genetics* **59**, 25-37
37. Trenkle, T., McClelland, M., Adlkofer, K., and Welsh, J. (2000) Major transcript variants of VAV3, a new member of the VAV family of guanine nucleotide exchange factors. *Gene* **245**, 139-149
38. Okumura, K., Kaneko, Y., Nonoguchi, K., Nishiyama, H., Yokoi, H., Higuchi, T., Itoh, K., Yoshida, O., Miki, T., and Fujita, J. (1997) Expression of a novel isoform of Vav, Vav-T, containing a single Src homology 3 domain in murine testicular germ cells. *Oncogene* **14**, 713-720
39. Schuebel, K. E., Bustelo, X. R., Nielsen, D. A., Song, B. J., Barbacid, M., Goldman, D., and Lee, I. J. (1996) Isolation and characterization of murine vav2, a member of the vav family of proto-oncogenes. *Oncogene* **13**, 363-371
40. Castresana, J., and Saraste, M. (1995) Does Vav bind to F-actin through a CH domain? *FEBS letters* **374**, 149-151
41. Bramham, J., Hodgkinson, J. L., Smith, B. O., Uhrin, D., Barlow, P. N., and Winder, S. J. (2002) Solution structure of the calponin CH domain and fitting to the 3D-helical reconstruction of F-actin:calponin. *Structure* **10**, 249-258
42. Zhou, Z., Yin, J., Dou, Z., Tang, J., Zhang, C., and Cao, Y. (2007) The calponin homology domain of Vav1 associates with calmodulin and is prerequisite to T cell antigen receptor-induced calcium release in Jurkat T lymphocytes. *The Journal of biological chemistry* **282**, 23737-23744
43. Amarasinghe, G. K., and Rosen, M. K. (2005) Acidic region tyrosines provide access points for allosteric activation of the autoinhibited Vav1 Dbl homology domain. *Biochemistry* **44**, 15257-15268

44. Hart, M. J., Eva, A., Zangrilli, D., Aaronson, S. A., Evans, T., Cerione, R. A., and Zheng, Y. (1994) Cellular transformation and guanine nucleotide exchange activity are catalyzed by a common domain on the dbl oncogene product. *The Journal of biological chemistry* **269**, 62-65
45. Schmidt, A., and Hall, A. (2002) Guanine nucleotide exchange factors for Rho GTPases: turning on the switch. *Genes & development* **16**, 1587-1609
46. Whitehead, I. P., Campbell, S., Rossman, K. L., and Der, C. J. (1997) Dbl family proteins. *Biochimica et biophysica acta* **1332**, F1-23
47. Scheffzek, K., and Welte, S. (2012) Pleckstrin homology (PH) like domains - versatile modules in protein-protein interaction platforms. *FEBS letters* **586**, 2662-2673
48. Moores, S. L., Selfors, L. M., Fredericks, J., Breit, T., Fujikawa, K., Alt, F. W., Brugge, J. S., and Swat, W. (2000) Vav family proteins couple to diverse cell surface receptors. *Molecular and cellular biology* **20**, 6364-6373
49. Olson, M. F., Pasteris, N. G., Gorski, J. L., and Hall, A. (1996) Faciogenital dysplasia protein (FGD1) and Vav, two related proteins required for normal embryonic development, are upstream regulators of Rho GTPases. *Current biology : CB* **6**, 1628-1633
50. Crespo, P., Schuebel, K. E., Ostrom, A. A., Gutkind, J. S., and Bustelo, X. R. (1997) Phosphotyrosine-dependent activation of Rac-1 GDP/GTP exchange by the vav proto-oncogene product. *Nature* **385**, 169-172
51. Han, J., Das, B., Wei, W., Van Aelst, L., Mosteller, R. D., Khosravi-Far, R., Westwick, J. K., Der, C. J., and Broek, D. (1997) Lck regulates Vav activation of members of the Rho family of GTPases. *Molecular and cellular biology* **17**, 1346-1353
52. Schuebel, K. E., Movilla, N., Rosa, J. L., and Bustelo, X. R. (1998) Phosphorylation-dependent and constitutive activation of Rho proteins by wild-type and oncogenic Vav-2. *The EMBO journal* **17**, 6608-6621
53. Abe, K., Rossman, K. L., Liu, B., Ritola, K. D., Chiang, D., Campbell, S. L., Burridge, K., and Der, C. J. (2000) Vav2 is an activator of Cdc42, Rac1, and RhoA. *The Journal of biological chemistry* **275**, 10141-10149
54. Gulbins, E., Coggeshall, K. M., Baier, G., Telford, D., Langlet, C., Baier-Bitterlich, G., Bonnefoy-Berard, N., Burn, P., Wittinghofer, A., and Altman, A. (1994) Direct stimulation of Vav guanine nucleotide exchange activity for Ras by phorbol esters and diglycerides. *Molecular and cellular biology* **14**, 4749-4758
55. Gulbins, E., Coggeshall, K. M., Langlet, C., Baier, G., Bonnefoy-Berard, N., Burn, P., Wittinghofer, A., Katzav, S., and Altman, A. (1994) Activation of Ras in vitro and in intact fibroblasts by the Vav guanine nucleotide exchange protein. *Molecular and cellular biology* **14**, 906-913
56. Bustelo, X. R., Suen, K. L., Leftleris, K., Meyers, C. A., and Barbacid, M. (1994) Vav cooperates with Ras to transform rodent fibroblasts but is not a Ras GDP/GTP exchange factor. *Oncogene* **9**, 2405-2413
57. Caloca, M. J., Zugaza, J. L., Matallanas, D., Crespo, P., and Bustelo, X. R. (2003) Vav mediates Ras stimulation by direct activation of the GDP/GTP exchange factor Ras GRP1. *The EMBO journal* **22**, 3326-3336
58. Dvorsky, R., and Ahmadian, M. R. (2004) Always look on the bright site of Rho: structural implications for a conserved intermolecular interface. *EMBO reports* **5**, 1130-1136
59. Movilla, N., Dosil, M., Zheng, Y., and Bustelo, X. R. (2001) How Vav proteins discriminate the GTPases Rac1 and RhoA from Cdc42. *Oncogene* **20**, 8057-8065
60. Heo, J., Thapar, R., and Campbell, S. L. (2005) Recognition and activation of Rho GTPases by Vav1 and Vav2 guanine nucleotide exchange factors. *Biochemistry* **44**, 6573-6585
61. Brooun, A., Foster, S. A., Chrencik, J. E., Chien, E. Y., Kolatkar, A. R., Streiff, M., Ramage, P., Widmer, H., Weckbecker, G., and Kuhn, P. (2007) Remedial strategies in structural proteomics: expression, purification, and crystallization of the Vav1/Rac1 complex. *Protein expression and purification* **53**, 51-62

62. Chrencik, J. E., Brooun, A., Zhang, H., Mathews, II, Hura, G. L., Foster, S. A., Perry, J. J., Streiff, M., Ramage, P., Widmer, H., Bokoch, G. M., Tainer, J. A., Weckbecker, G., and Kuhn, P. (2008) Structural basis of guanine nucleotide exchange mediated by the T-cell essential Vav1. *Journal of molecular biology* **380**, 828-843
63. Rapley, J., Tybulewicz, V. L., and Rittinger, K. (2008) Crucial structural role for the PH and C1 domains of the Vav1 exchange factor. *EMBO reports* **9**, 655-661
64. Schlessinger, J., and Lemmon, M. A. (2003) SH2 and PTB domains in tyrosine kinase signaling. *Science's STKE : signal transduction knowledge environment* **2003**, RE12
65. Songyang, Z., Shoelson, S. E., McGlade, J., Olivier, P., Pawson, T., Bustelo, X. R., Barbacid, M., Sabe, H., Hanafusa, H., Yi, T., and et al. (1994) Specific motifs recognized by the SH2 domains of Csk, 3BP2, fps/fes, GRB-2, HCP, SHC, Syk, and Vav. *Molecular and cellular biology* **14**, 2777-2785
66. Saksela, K., and Permi, P. (2012) SH3 domain ligand binding: What's the consensus and where's the specificity? *FEBS letters* **586**, 2609-2614
67. Agrawal, V., and Kishan, K. V. (2002) Promiscuous binding nature of SH3 domains to their target proteins. *Protein and peptide letters* **9**, 185-193
68. Bustelo, X. R., and Barbacid, M. (1992) Tyrosine phosphorylation of the vav proto-oncogene product in activated B cells. *Science* **256**, 1196-1199
69. Margolis, B., Hu, P., Katzav, S., Li, W., Oliver, J. M., Ullrich, A., Weiss, A., and Schlessinger, J. (1992) Tyrosine phosphorylation of vav proto-oncogene product containing SH2 domain and transcription factor motifs. *Nature* **356**, 71-74
70. Micouin, A., Wietzerbin, J., Steunou, V., and Martyre, M. C. (2000) p95(vav) associates with the type I interferon (IFN) receptor and contributes to the antiproliferative effect of IFN-alpha in megakaryocytic cell lines. *Oncogene* **19**, 387-394
71. Alai, M., Mui, A. L., Cutler, R. L., Bustelo, X. R., Barbacid, M., and Krystal, G. (1992) Steel factor stimulates the tyrosine phosphorylation of the proto-oncogene product, p95vav, in human hemopoietic cells. *The Journal of biological chemistry* **267**, 18021-18025
72. Bustelo, X. R., Ledbetter, J. A., and Barbacid, M. (1992) Product of vav proto-oncogene defines a new class of tyrosine protein kinase substrates. *Nature* **356**, 68-71
73. Uddin, S., Katzav, S., White, M. F., and Plataniias, L. C. (1995) Insulin-dependent tyrosine phosphorylation of the vav protooncogene product in cells of hematopoietic origin. *The Journal of biological chemistry* **270**, 7712-7716
74. Katzav, S., Sutherland, M., Packham, G., Yi, T., and Weiss, A. (1994) The protein tyrosine kinase ZAP-70 can associate with the SH2 domain of proto-Vav. *The Journal of biological chemistry* **269**, 32579-32585
75. Machide, M., Mano, H., and Todokoro, K. (1995) Interleukin 3 and erythropoietin induce association of Vav with Tec kinase through Tec homology domain. *Oncogene* **11**, 619-625
76. Dombroski, D., Houghtling, R. A., Labno, C. M., Precht, P., Takesono, A., Caplen, N. J., Billadeau, D. D., Wange, R. L., Burkhardt, J. K., and Schwartzberg, P. L. (2005) Kinase-independent functions for Itk in TCR-induced regulation of Vav and the actin cytoskeleton. *J Immunol* **174**, 1385-1392
77. Ye, Z. S., and Baltimore, D. (1994) Binding of Vav to Grb2 through dimerization of Src homology 3 domains. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **91**, 12629-12633
78. Perez-Villar, J. J., Whitney, G. S., Sitnick, M. T., Dunn, R. J., Venkatesan, S., O'Day, K., Schieven, G. L., Lin, T. A., and Kanner, S. B. (2002) Phosphorylation of the linker for activation of T-cells by Itk promotes recruitment of Vav. *Biochemistry* **41**, 10732-10740
79. Huby, R. D., Carlile, G. W., and Ley, S. C. (1995) Interactions between the protein-tyrosine kinase ZAP-70, the proto-oncoprotein Vav, and tubulin in Jurkat T cells. *The Journal of biological chemistry* **270**, 30241-30244

80. Hobert, O., Schilling, J. W., Beckerle, M. C., Ullrich, A., and Jallal, B. (1996) SH3 domain-dependent interaction of the proto-oncogene product Vav with the focal contact protein zyxin. *Oncogene* **12**, 1577-1581
81. Garcia-Bernal, D., Pardo-Cabanas, M., Dios-Esponera, A., Samaniego, R., Hernan, P. d. I. O. D., and Teixido, J. (2009) Chemokine-induced Zap70 kinase-mediated dissociation of the Vav1-talin complex activates alpha4beta1 integrin for T cell adhesion. *Immunity* **31**, 953-964
82. Piccolella, E., Spadaro, F., Ramoni, C., Marinari, B., Costanzo, A., Levrero, M., Thomson, L., Abraham, R. T., and Tuosto, L. (2003) Vav-1 and the IKK alpha subunit of I kappa B kinase functionally associate to induce NF-kappa B activation in response to CD28 engagement. *J Immunol* **170**, 2895-2903
83. Bertagnolo, V., Brugnoli, F., Marchisio, M., Celeghini, C., Carini, C., and Capitani, S. (2004) Association of PI 3-K with tyrosine phosphorylated Vav is essential for its activity in neutrophil-like maturation of myeloid cells. *Cellular signalling* **16**, 423-433
84. Braiman, A., Barda-Saad, M., Sommers, C. L., and Samelson, L. E. (2006) Recruitment and activation of PLCgamma1 in T cells: a new insight into old domains. *The EMBO journal* **25**, 774-784
85. Groysman, M., Russek, C. S., and Katzav, S. (2000) Vav, a GDP/GTP nucleotide exchange factor, interacts with GDIs, proteins that inhibit GDP/GTP dissociation. *FEBS letters* **467**, 75-80
86. Groysman, M., Hornstein, I., Alcover, A., and Katzav, S. (2002) Vav1 and Ly-GDI two regulators of Rho GTPases, function cooperatively as signal transducers in T cell antigen receptor-induced pathways. *The Journal of biological chemistry* **277**, 50121-50130
87. Clevenger, C. V., Ngo, W., Sokol, D. L., Luger, S. M., and Gewirtz, A. M. (1995) Vav is necessary for prolactin-stimulated proliferation and is translocated into the nucleus of a T-cell line. *The Journal of biological chemistry* **270**, 13246-13253
88. Houliard, M., Arudchandran, R., Regnier-Ricard, F., Germani, A., Gisselbrecht, S., Blank, U., Rivera, J., and Varin-Blank, N. (2002) Vav1 is a component of transcriptionally active complexes. *The Journal of experimental medicine* **195**, 1115-1127
89. Bustelo, X. R., Suen, K. L., Michael, W. M., Dreyfuss, G., and Barbacid, M. (1995) Association of the vav proto-oncogene product with poly(rC)-specific RNA-binding proteins. *Molecular and cellular biology* **15**, 1324-1332
90. Romero, F., Germani, A., Puvion, E., Camonis, J., Varin-Blank, N., Gisselbrecht, S., and Fischer, S. (1998) Vav binding to heterogeneous nuclear ribonucleoprotein (hnRNP) C. Evidence for Vav-hnRNP interactions in an RNA-dependent manner. *The Journal of biological chemistry* **273**, 5923-5931
91. Romero, F., Dargemont, C., Pozo, F., Reeves, W. H., Camonis, J., Gisselbrecht, S., and Fischer, S. (1996) p95vav associates with the nuclear protein Ku-70. *Molecular and cellular biology* **16**, 37-44
92. Lazer, G., Pe'er, L., Schapira, V., Richard, S., and Katzav, S. (2007) The association of Sam68 with Vav1 contributes to tumorigenesis. *Cellular signalling* **19**, 2479-2486
93. Lopez-Lago, M., Lee, H., Cruz, C., Movilla, N., and Bustelo, X. R. (2000) Tyrosine phosphorylation mediates both activation and downmodulation of the biological activity of Vav. *Molecular and cellular biology* **20**, 1678-1691
94. Miletic, A. V., Sakata-Sogawa, K., Hiroshima, M., Hamann, M. J., Gomez, T. S., Ota, N., Kloeppel, T., Kanagawa, O., Tokunaga, M., Billadeau, D. D., and Swat, W. (2006) Vav1 acidic region tyrosine 174 is required for the formation of T cell receptor-induced microclusters and is essential in T cell development and activation. *The Journal of biological chemistry* **281**, 38257-38265
95. Aghazadeh, B., Lowry, W. E., Huang, X. Y., and Rosen, M. K. (2000) Structural basis for relief of autoinhibition of the Dbl homology domain of proto-oncogene Vav by tyrosine phosphorylation. *Cell* **102**, 625-633

96. Yu, B., Martins, I. R., Li, P., Amarasinghe, G. K., Umetani, J., Fernandez-Zapico, M. E., Billadeau, D. D., Machius, M., Tomchick, D. R., and Rosen, M. K. (2010) Structural and energetic mechanisms of cooperative autoinhibition and activation of Vav1. *Cell* **140**, 246-256
97. Zugaza, J. L., Lopez-Lago, M. A., Caloca, M. J., Dosil, M., Movilla, N., and Bustelo, X. R. (2002) Structural determinants for the biological activity of Vav proteins. *The Journal of biological chemistry* **277**, 45377-45392
98. Koncz, G., Kerekes, K., Chakrabandhu, K., and Hueber, A. O. (2008) Regulating Vav1 phosphorylation by the SHP-1 tyrosine phosphatase is a fine-tuning mechanism for the negative regulation of DISC formation and Fas-mediated cell death signaling. *Cell Death Differ* **15**, 494-503
99. Stebbins, C. C., Watzl, C., Billadeau, D. D., Leibson, P. J., Burshtyn, D. N., and Long, E. O. (2003) Vav1 dephosphorylation by the tyrosine phosphatase SHP-1 as a mechanism for inhibition of cellular cytotoxicity. *Molecular and cellular biology* **23**, 6291-6299
100. Mesecke, S., Urlaub, D., Busch, H., Eils, R., and Watzl, C. (2011) Integration of activating and inhibitory receptor signaling by regulated phosphorylation of Vav1 in immune cells. *Science signaling* **4**, ra36
101. Rao, N., Dodge, I., and Band, H. (2002) The Cbl family of ubiquitin ligases: critical negative regulators of tyrosine kinase signaling in the immune system. *Journal of leukocyte biology* **71**, 753-763
102. Chiang, Y. J., Kole, H. K., Brown, K., Naramura, M., Fukuhara, S., Hu, R. J., Jang, I. K., Gutkind, J. S., Shevach, E., and Gu, H. (2000) Cbl-b regulates the CD28 dependence of T-cell activation. *Nature* **403**, 216-220
103. Miura-Shimura, Y., Duan, L., Rao, N. L., Reddi, A. L., Shimura, H., Rottapel, R., Druker, B. J., Tsygankov, A., Band, V., and Band, H. (2003) Cbl-mediated ubiquitylation and negative regulation of Vav. *The Journal of biological chemistry* **278**, 38495-38504
104. De Sepulveda, P., Ilangumaran, S., and Rottapel, R. (2000) Suppressor of cytokine signaling-1 inhibits VAV function through protein degradation. *The Journal of biological chemistry* **275**, 14005-14008
105. Germani, A., Romero, F., Houlard, M., Camonis, J., Gisselbrecht, S., Fischer, S., and Varin-Blank, N. (1999) hSiah2 is a new Vav binding protein which inhibits Vav-mediated signaling pathways. *Molecular and cellular biology* **19**, 3798-3807
106. Hornstein, I., Alcover, A., and Katzav, S. (2004) Vav proteins, masters of the world of cytoskeleton organization. *Cellular signalling* **16**, 1-11
107. Zeng, R., Cannon, J. L., Abraham, R. T., Way, M., Billadeau, D. D., Bubeck-Wardenberg, J., and Burkhardt, J. K. (2003) SLP-76 coordinates Nck-dependent Wiskott-Aldrich syndrome protein recruitment with Vav-1/Cdc42-dependent Wiskott-Aldrich syndrome protein activation at the T cell-APC contact site. *J Immunol* **171**, 1360-1368
108. Barda-Saad, M., Shirasu, N., Pauker, M. H., Hassan, N., Perl, O., Balbo, A., Yamaguchi, H., Houtman, J. C., Appella, E., Schuck, P., and Samelson, L. E. (2010) Cooperative interactions at the SLP-76 complex are critical for actin polymerization. *The EMBO journal* **29**, 2315-2328
109. Faure, S., Salazar-Fontana, L. I., Semichon, M., Tybulewicz, V. L., Bismuth, G., Trautmann, A., Germain, R. N., and Delon, J. (2004) ERM proteins regulate cytoskeleton relaxation promoting T cell-APC conjugation. *Nature immunology* **5**, 272-279
110. Miletic, A. V., Graham, D. B., Sakata-Sogawa, K., Hiroshima, M., Hamann, M. J., Cemerski, S., Kloeppel, T., Billadeau, D. D., Kanagawa, O., Tokunaga, M., and Swat, W. (2009) Vav links the T cell antigen receptor to the actin cytoskeleton and T cell activation independently of intrinsic Guanine nucleotide exchange activity. *PloS one* **4**, e6599
111. Ksionda, O., Saveliev, A., Kochl, R., Rapley, J., Faroudi, M., Smith-Garvin, J. E., Wulfiging, C., Rittinger, K., Carter, T., and Tybulewicz, V. L. (2012) Mechanism and function of Vav1 localization in TCR signaling. *Journal of cell science*

112. Bauch, A., Alt, F. W., Crabtree, G. R., and Snapper, S. B. (2000) The cytoskeleton in lymphocyte signaling. *Adv Immunol* **75**, 89-114
113. Reicher, B., and Barda-Saad, M. (2010) Multiple pathways leading from the T-cell antigen receptor to the actin cytoskeleton network. *FEBS letters* **584**, 4858-4864
114. Hehner, S. P., Hofmann, T. G., Dienz, O., Droge, W., and Schmitz, M. L. (2000) Tyrosine-phosphorylated Vav1 as a point of integration for T-cell receptor- and CD28-mediated activation of JNK, p38, and interleukin-2 transcription. *The Journal of biological chemistry* **275**, 18160-18171
115. Reynolds, L. F., Smyth, L. A., Norton, T., Freshney, N., Downward, J., Kioussis, D., and Tybulewicz, V. L. (2002) Vav1 transduces T cell receptor signals to the activation of phospholipase C-gamma1 via phosphoinositide 3-kinase-dependent and -independent pathways. *The Journal of experimental medicine* **195**, 1103-1114
116. Knyazhitsky, M., Moas, E., Shaginov, E., Luria, A., and Braiman, A. (2012) Vav1 oncogenic mutation inhibits T cell receptor-induced calcium mobilization through inhibition of phospholipase Cgamma1 activation. *The Journal of biological chemistry* **287**, 19725-19735
117. Kaminski, S., Del Pozo, M. A., Hipskind, R. A., Altman, A., and Villalba, M. (2004) Distinct functions of Vav1 in JNK1 activation in Jurkat T cells versus non-haematopoietic cells. *Scand J Immunol* **59**, 527-535
118. Reynolds, L. F., de Bettignies, C., Norton, T., Beeser, A., Chernoff, J., and Tybulewicz, V. L. (2004) Vav1 transduces T cell receptor signals to the activation of the Ras/ERK pathway via LAT, Sos, and RasGRP1. *The Journal of biological chemistry* **279**, 18239-18246
119. Katzav, S. (2004) Vav1: an oncogene that regulates specific transcriptional activation of T cells. *Blood* **103**, 2443-2451
120. Wu, J., Katzav, S., and Weiss, A. (1995) A functional T-cell receptor signaling pathway is required for p95vav activity. *Molecular and cellular biology* **15**, 4337-4346
121. Kuhne, M. R., Ku, G., and Weiss, A. (2000) A guanine nucleotide exchange factor-independent function of Vav1 in transcriptional activation. *The Journal of biological chemistry* **275**, 2185-2190
122. Schmitz, M. L., Bacher, S., and Dienz, O. (2003) NF-kappaB activation pathways induced by T cell costimulation. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **17**, 2187-2193
123. Dienz, O., Hehner, S. P., Droge, W., and Schmitz, M. L. (2000) Synergistic activation of NF-kappa B by functional cooperation between vav and PKCtheta in T lymphocytes. *The Journal of biological chemistry* **275**, 24547-24551
124. Herndon, T. M., Shan, X. C., Tsokos, G. C., and Wange, R. L. (2001) ZAP-70 and SLP-76 regulate protein kinase C-theta and NF-kappa B activation in response to engagement of CD3 and CD28. *J Immunol* **166**, 5654-5664
125. Cao, Y., Janssen, E. M., Duncan, A. W., Altman, A., Billadeau, D. D., and Abraham, R. T. (2002) Pleiotropic defects in TCR signaling in a Vav-1-null Jurkat T-cell line. *The EMBO journal* **21**, 4809-4819
126. Moller, A., Dienz, O., Hehner, S. P., Droge, W., and Schmitz, M. L. (2001) Protein kinase C theta cooperates with Vav1 to induce JNK activity in T-cells. *The Journal of biological chemistry* **276**, 20022-20028
127. Kaminuma, O., Deckert, M., Elly, C., Liu, Y. C., and Altman, A. (2001) Vav-Rac1-mediated activation of the c-Jun N-terminal kinase/c-Jun/AP-1 pathway plays a major role in stimulation of the distal NFAT site in the interleukin-2 gene promoter. *Molecular and cellular biology* **21**, 3126-3136
128. Turner, M., and Billadeau, D. D. (2002) VAV proteins as signal integrators for multi-subunit immune-recognition receptors. *Nature reviews. Immunology* **2**, 476-486
129. Fischer, K. D., Zmuldzinas, A., Gardner, S., Barbacid, M., Bernstein, A., and Guidos, C. (1995) Defective T-cell receptor signalling and positive selection of Vav-deficient CD4+ CD8+ thymocytes. *Nature* **374**, 474-477

130. Turner, M., Mee, P. J., Walters, A. E., Quinn, M. E., Mellor, A. L., Zamoyska, R., and Tybulewicz, V. L. (1997) A requirement for the Rho-family GTP exchange factor Vav in positive and negative selection of thymocytes. *Immunity* **7**, 451-460
131. Zhang, R., Alt, F. W., Davidson, L., Orkin, S. H., and Swat, W. (1995) Defective signalling through the T- and B-cell antigen receptors in lymphoid cells lacking the vav proto-oncogene. *Nature* **374**, 470-473
132. Tarakhovsky, A., Turner, M., Schaal, S., Mee, P. J., Duddy, L. P., Rajewsky, K., and Tybulewicz, V. L. (1995) Defective antigen receptor-mediated proliferation of B and T cells in the absence of Vav. *Nature* **374**, 467-470
133. Holsinger, L. J., Graef, I. A., Swat, W., Chi, T., Bautista, D. M., Davidson, L., Lewis, R. S., Alt, F. W., and Crabtree, G. R. (1998) Defects in actin-cap formation in Vav-deficient mice implicate an actin requirement for lymphocyte signal transduction. *Current biology : CB* **8**, 563-572
134. Tedford, K., Nitschke, L., Girkontaite, I., Charlesworth, A., Chan, G., Sakk, V., Barbacid, M., and Fischer, K. D. (2001) Compensation between Vav-1 and Vav-2 in B cell development and antigen receptor signaling. *Nature immunology* **2**, 548-555
135. Gulbranson-Judge, A., Tybulewicz, V. L., Walters, A. E., Toellner, K. M., MacLennan, I. C., and Turner, M. (1999) Defective immunoglobulin class switching in Vav-deficient mice is attributable to compromised T cell help. *European journal of immunology* **29**, 477-487
136. Glassford, J., Holman, M., Banerji, L., Clayton, E., Klaus, G. G., Turner, M., and Lam, E. W. (2001) Vav is required for cyclin D2 induction and proliferation of mouse B lymphocytes activated via the antigen Receptor. *The Journal of biological chemistry* **276**, 41040-41048
137. Fujikawa, K., Miletic, A. V., Alt, F. W., Faccio, R., Brown, T., Hoog, J., Fredericks, J., Nishi, S., Mildiner, S., Moores, S. L., Brugge, J., Rosen, F. S., and Swat, W. (2003) Vav1/2/3-null mice define an essential role for Vav family proteins in lymphocyte development and activation but a differential requirement in MAPK signaling in T and B cells. *The Journal of experimental medicine* **198**, 1595-1608
138. Ruiz, S., Santos, E., and Bustelo, X. R. (2009) The use of knockout mice reveals a synergistic role of the Vav1 and Rasgrf2 gene deficiencies in lymphomagenesis and metastasis. *PLoS one* **4**, e8229
139. Dumont, C., Corsoni-Tadrzak, A., Ruf, S., de Boer, J., Williams, A., Turner, M., Kioussis, D., and Tybulewicz, V. L. (2009) Rac GTPases play critical roles in early T-cell development. *Blood* **113**, 3990-3998
140. Oberley, M. J., Wang, D. S., and Yang, D. T. (2012) Vav1 in hematologic neoplasms, a mini review. *American journal of blood research* **2**, 1-8
141. Berquam-Vrieze, K. E., Nannapaneni, K., Brett, B. T., Holmfeldt, L., Ma, J., Zagorodna, O., Jenkins, N. A., Copeland, N. G., Meyerholz, D. K., Knudson, C. M., Mullighan, C. G., Scheetz, T. E., and Dupuy, A. J. (2011) Cell of origin strongly influences genetic selection in a mouse model of T-ALL. *Blood* **118**, 4646-4656
142. Chen, K., Li, W., Major, J., Rahaman, S. O., Febbraio, M., and Silverstein, R. L. (2011) Vav guanine nucleotide exchange factors link hyperlipidemia and a prothrombotic state. *Blood* **117**, 5744-5750
143. Kaminski, S., Adjali, O., Jacquet, C., Garaude, J., Keriell, A., Lassaux, A., Hipskind, R., Sitbon, M., Taylor, N., and Villalba, M. (2012) The protooncogene Vav1 regulates murine leukemia virus-induced T-cell leukemogenesis. *Oncoimmunology* **1**, 600-608
144. Prieto-Sanchez, R. M., Hernandez, J. A., Garcia, J. L., Gutierrez, N. C., San Miguel, J., Bustelo, X. R., and Hernandez, J. M. (2006) Overexpression of the VAV proto-oncogene product is associated with B-cell chronic lymphocytic leukaemia displaying loss on 13q. *British journal of haematology* **133**, 642-645
145. Hollmann, A., Aloyz, R., Baker, K., Dirnhofer, S., Owens, T., Sladek, R., and Tzankov, A. (2010) Vav-1 expression correlates with NFkappaB activation and CD40-mediated cell death in diffuse large B-cell lymphoma cell lines. *Hematological oncology* **28**, 142-150

146. Bertagnolo, V., Brugnoli, F., Mischiati, C., Sereni, A., Bavelloni, A., Carini, C., and Capitani, S. (2005) Vav promotes differentiation of human tumoral myeloid precursors. *Experimental cell research* **306**, 56-63
147. Brugnoli, F., Lambertini, E., Varin-Blank, N., Piva, R., Marchisio, M., Grassilli, S., Miscia, S., Capitani, S., and Bertagnolo, V. (2010) Vav1 and PU.1 are recruited to the CD11b promoter in APL-derived promyelocytes: role of Vav1 in modulating PU.1-containing complexes during ATRA-induced differentiation. *Experimental cell research* **316**, 38-47
148. Bertagnolo, V., Brugnoli, F., Grassilli, S., Nika, E., and Capitani, S. (2012) Vav1 in differentiation of tumoral promyelocytes. *Cellular signalling* **24**, 612-620
149. Bertagnolo, V., Grassilli, S., D'Aguanno, S., Brugnoli, F., Bavelloni, A., Faenza, I., Nika, E., Urbani, A., Cocco, L., and Capitani, S. (2010) Mass spectrometry-based identification of Y745 of Vav1 as a tyrosine residue crucial in maturation of acute promyelocytic leukemia-derived cells. *Journal of proteome research* **9**, 752-760
150. Jagodic, M., Colacios, C., Nohra, R., Dejean, A. S., Beyeen, A. D., Khademi, M., Casemayou, A., Lamouroux, L., Duthoit, C., Papapietro, O., Sjöholm, L., Bernard, I., Lagrange, D., Dahlman, I., Lundmark, F., Oturai, A. B., Soendergaard, H. B., Kempainen, A., Saarela, J., Tienari, P. J., Harbo, H. F., Spurkland, A., Ramagopalan, S. V., Sadovnick, D. A., Ebers, G. C., Seddighzadeh, M., Klareskog, L., Alfredsson, L., Padyukov, L., Hillert, J., Clanet, M., Edan, G., Fontaine, B., Fournie, G. J., Kockum, I., Saoudi, A., and Olsson, T. (2009) A role for VAV1 in experimental autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis. *Sci Transl Med* **1**, 10ra21
151. Katzav, S., Cleveland, J. L., Heslop, H. E., and Pulido, D. (1991) Loss of the amino-terminal helix-loop-helix domain of the vav proto-oncogene activates its transforming potential. *Molecular and cellular biology* **11**, 1912-1920
152. Abe, K., Whitehead, I. P., O'Bryan, J. P., and Der, C. J. (1999) Involvement of NH(2)-terminal sequences in the negative regulation of Vav signaling and transforming activity. *The Journal of biological chemistry* **274**, 30410-30418
153. Zeng, L., Sachdev, P., Yan, L., Chan, J. L., Trenkle, T., McClelland, M., Welsh, J., and Wang, L. H. (2000) Vav3 mediates receptor protein tyrosine kinase signaling, regulates GTPase activity, modulates cell morphology, and induces cell transformation. *Molecular and cellular biology* **20**, 9212-9224
154. Katzav, S. (1993) Single point mutations in the SH2 domain impair the transforming potential of vav and fail to activate proto-vav. *Oncogene* **8**, 1757-1763
155. Groysman, M., Nagano, M., Shaanan, B., and Katzav, S. (1998) Mutagenic analysis of Vav reveals that an intact SH3 domain is required for transformation. *Oncogene* **17**, 1597-1606
156. Palmby, T. R., Abe, K., and Der, C. J. (2002) Critical role of the pleckstrin homology and cysteine-rich domains in Vav signaling and transforming activity. *The Journal of biological chemistry* **277**, 39350-39359
157. Bartolome, R. A., Molina-Ortiz, I., Samaniego, R., Sanchez-Mateos, P., Bustelo, X. R., and Teixido, J. (2006) Activation of Vav/Rho GTPase signaling by CXCL12 controls membrane-type matrix metalloproteinase-dependent melanoma cell invasion. *Cancer research* **66**, 248-258
158. Patel, V., Rosenfeldt, H. M., Lyons, R., Servitja, J. M., Bustelo, X. R., Siroff, M., and Gutkind, J. S. (2007) Persistent activation of Rac1 in squamous carcinomas of the head and neck: evidence for an EGFR/Vav2 signaling axis involved in cell invasion. *Carcinogenesis* **28**, 1145-1152
159. Lai, S. Y., Ziober, A. F., Lee, M. N., Cohen, N. A., Falls, E. M., and Ziober, B. L. (2008) Activated Vav2 modulates cellular invasion through Rac1 and Cdc42 in oral squamous cell carcinoma. *Oral oncology* **44**, 683-688

160. Dong, Z., Liu, Y., Lu, S., Wang, A., Lee, K., Wang, L. H., and Revelo, M. (2006) Vav3 oncogene is overexpressed and regulates cell growth and androgen receptor activity in human prostate cancer. *Mol Endocrinol* **20**, 2315-2325
161. Liu, Y., Mo, J. Q., Hu, Q., Boivin, G., Levin, L., Lu, S., Yang, D., and Dong, Z. (2008) Targeted overexpression of vav3 oncogene in prostatic epithelium induces nonbacterial prostatitis and prostate cancer. *Cancer research* **68**, 6396-6406
162. Rao, S., Lyons, L. S., Fahrenholtz, C. D., Wu, F., Farooq, A., Balkan, W., and Burnstein, K. L. (2012) A novel nuclear role for the Vav3 nucleotide exchange factor in androgen receptor coactivation in prostate cancer. *Oncogene* **31**, 716-727
163. Lee, K., Liu, Y., Mo, J. Q., Zhang, J., Dong, Z., and Lu, S. (2008) Vav3 oncogene activates estrogen receptor and its overexpression may be involved in human breast cancer. *BMC cancer* **8**, 158
164. Hunter, S. G., Zhuang, G., Brantley-Sieders, D., Swat, W., Cowan, C. W., and Chen, J. (2006) Essential role of Vav family guanine nucleotide exchange factors in EphA receptor-mediated angiogenesis. *Molecular and cellular biology* **26**, 4830-4842
165. Brantley-Sieders, D. M., Zhuang, G., Vaught, D., Freeman, T., Hwang, Y., Hicks, D., and Chen, J. (2009) Host deficiency in Vav2/3 guanine nucleotide exchange factors impairs tumor growth, survival, and angiogenesis in vivo. *Molecular cancer research : MCR* **7**, 615-623
166. Citterio, C., Menacho-Marquez, M., Garcia-Escudero, R., Larive, R. M., Barreiro, O., Sanchez-Madrid, F., Paramio, J. M., and Bustelo, X. R. (2012) The rho exchange factors vav2 and vav3 control a lung metastasis-specific transcriptional program in breast cancer cells. *Science signaling* **5**, ra71
167. Hornstein, I., Pikarsky, E., Groysman, M., Amir, G., Peylan-Ramu, N., and Katzav, S. (2003) The haematopoietic specific signal transducer Vav1 is expressed in a subset of human neuroblastomas. *The Journal of pathology* **199**, 526-533
168. Fernandez-Zapico, M. E., Gonzalez-Paz, N. C., Weiss, E., Savoy, D. N., Molina, J. R., Fonseca, R., Smyrk, T. C., Chari, S. T., Urrutia, R., and Billadeau, D. D. (2005) Ectopic expression of VAV1 reveals an unexpected role in pancreatic cancer tumorigenesis. *Cancer cell* **7**, 39-49
169. Lazer, G., Idelchuk, Y., Schapira, V., Pikarsky, E., and Katzav, S. (2009) The haematopoietic specific signal transducer Vav1 is aberrantly expressed in lung cancer and plays a role in tumourigenesis. *The Journal of pathology* **219**, 25-34
170. Gjerstorff, M. F., Benoit, V. M., Laenkholtm, A. V., Nielsen, O., Johansen, L. E., and Ditzel, H. J. (2006) Identification of genes with altered expression in medullary breast cancer vs. ductal breast cancer and normal breast epithelia. *International journal of oncology* **28**, 1327-1335
171. Lane, J., Martin, T. A., Mansel, R. E., and Jiang, W. G. (2008) The expression and prognostic value of the guanine nucleotide exchange factors (GEFs) Trio, Vav1 and TIAM-1 in human breast cancer. *International seminars in surgical oncology : ISSO* **5**, 23
172. Sebban, S., Farago, M., Gashai, D., Ilan, L., Pikarsky, E., Ben-Porath, I., and Katzav, S. (2013) Vav1 fine tunes p53 control of apoptosis versus proliferation in breast cancer. *PLoS one* **8**, e54321
173. Ilan, L., and Katzav, S. (2012) Human Vav1 expression in hematopoietic and cancer cell lines is regulated by c-Myb and by CpG methylation. *PLoS one* **7**, e29939
174. Palmby, T. R., Abe, K., Karnoub, A. E., and Der, C. J. (2004) Vav transformation requires activation of multiple GTPases and regulation of gene expression. *Molecular cancer research : MCR* **2**, 702-711
175. Lee, M. H., Koria, P., Qu, J., and Andreadis, S. T. (2009) JNK phosphorylates beta-catenin and regulates adherens junctions. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **23**, 3874-3883

176. Noren, N. K., Liu, B. P., Burridge, K., and Kreft, B. (2000) p120 catenin regulates the actin cytoskeleton via Rho family GTPases. *The Journal of cell biology* **150**, 567-580
177. Mayer, B. J., and Hanafusa, H. (1990) Mutagenic analysis of the v-crk oncogene: requirement for SH2 and SH3 domains and correlation between increased cellular phosphotyrosine and transformation. *Journal of virology* **64**, 3581-3589
178. Jackson, P. K., Paskind, M., and Baltimore, D. (1993) Mutation of a phenylalanine conserved in SH3-containing tyrosine kinases activates the transforming ability of c-Abl. *Oncogene* **8**, 1943-1956
179. Brasher, B. B., Roumiantsev, S., and Van Etten, R. A. (2001) Mutational analysis of the regulatory function of the c-Abl Src homology 3 domain. *Oncogene* **20**, 7744-7752
180. Erpel, T., Superti-Furga, G., and Courtneidge, S. A. (1995) Mutational analysis of the Src SH3 domain: the same residues of the ligand binding surface are important for intra- and intermolecular interactions. *The EMBO journal* **14**, 963-975
181. Hirai, H., and Varmus, H. E. (1990) Mutations in src homology regions 2 and 3 of activated chicken c-src that result in preferential transformation of mouse or chicken cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **87**, 8592-8596
182. Lee, M. H., Padmashali, R., Koria, P., and Andreadis, S. T. (2011) JNK regulates binding of alpha-catenin to adherens junctions and cell-cell adhesion. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **25**, 613-623
183. Doble, B. W., and Woodgett, J. R. (2003) GSK-3: tricks of the trade for a multi-tasking kinase. *Journal of cell science* **116**, 1175-1186
184. Valenta, T., Hausmann, G., and Basler, K. (2012) The many faces and functions of beta-catenin. *The EMBO journal* **31**, 2714-2736
185. Li, V. S., Ng, S. S., Boersema, P. J., Low, T. Y., Karthaus, W. R., Gerlach, J. P., Mohammed, S., Heck, A. J., Maurice, M. M., Mahmoudi, T., and Clevers, H. (2012) Wnt signaling through inhibition of beta-catenin degradation in an intact Axin1 complex. *Cell* **149**, 1245-1256
186. Faux, M. C., Coates, J. L., Kershaw, N. J., Layton, M. J., and Burgess, A. W. (2010) Independent interactions of phosphorylated beta-catenin with E-cadherin at cell-cell contacts and APC at cell protrusions. *PloS one* **5**, e14127
187. Maher, M. T., Flozak, A. S., Stocker, A. M., Chenn, A., and Gottardi, C. J. (2009) Activity of the beta-catenin phosphodestruction complex at cell-cell contacts is enhanced by cadherin-based adhesion. *The Journal of cell biology* **186**, 219-228
188. McCormack, J., Welsh, N. J., and Braga, V. M. (2013) Cycling around cell-cell adhesion with Rho GTPase regulators. *Journal of cell science* **126**, 379-391
189. Esufali, S., and Bapat, B. (2004) Cross-talk between Rac1 GTPase and dysregulated Wnt signaling pathway leads to cellular redistribution of beta-catenin and TCF/LEF-mediated transcriptional activation. *Oncogene* **23**, 8260-8271
190. Lovatt, M., and Bijlmakers, M. J. (2010) Stabilisation of beta-catenin downstream of T cell receptor signalling. *PloS one* **5**
191. Fagotto, F. (2013) Looking beyond the Wnt pathway for the deep nature of beta-catenin. *EMBO reports* **14**, 422-433
192. Toualbi, K., Guller, M. C., Mauriz, J. L., Labalette, C., Buendia, M. A., Mauviel, A., and Bernuau, D. (2007) Physical and functional cooperation between AP-1 and beta-catenin for the regulation of TCF-dependent genes. *Oncogene* **26**, 3492-3502
193. Du, C., Zhang, C., Li, Z., Biswas, M. H., and Balaji, K. C. (2012) Beta-catenin phosphorylated at threonine 120 antagonizes generation of active beta-catenin by spatial localization in trans-Golgi network. *PloS one* **7**, e33830
194. Sadot, E., Conacci-Sorrell, M., Zhurinsky, J., Shnizer, D., Lando, Z., Zharhary, D., Kam, Z., Ben-Ze'ev, A., and Geiger, B. (2002) Regulation of S33/S37 phosphorylated beta-catenin in normal and transformed cells. *Journal of cell science* **115**, 2771-2780

195. Staal, F. J., and Sen, J. M. (2008) The canonical Wnt signaling pathway plays an important role in lymphopoiesis and hematopoiesis. *European journal of immunology* **38**, 1788-1794
196. Saveliev, A., Vanes, L., Ksionda, O., Rapley, J., Smerdon, S. J., Rittinger, K., and Tybulewicz, V. L. (2009) Function of the nucleotide exchange activity of vav1 in T cell development and activation. *Science signaling* **2**, ra83

Résumé :

Au cours de la tumorigénèse, les cellules acquièrent de nouvelles propriétés migratoires et adhésives qui peuvent aller jusqu'au développement de métastases notamment grâce à l'activité des GTPases. Les GTPases possèdent divers régulateurs dont les facteurs d'échange nucléotidique (Guanosine Exchange Factor : GEF). Parmi ceux-ci, le facteur d'échange Vav1 est un proto-oncogène d'expression hématopoïétique stricte. La délétion (région N-terminale) de certains domaines régulateurs de son activité GEF génère une forme capable de transformer les fibroblastes NIH3T3. Cette transformation passe alors par l'activation constitutive des GTPases Rho. Vav1 possède aussi une fonction adaptatrice qui permet des interactions protéine-protéine via ses domaines d'homologie à Src (SH) (triade NSH3-SH2-CSH3). Afin de déterminer le rôle de ces domaines adaptateurs sur la capacité transformante du proto-oncogène Vav1 nous avons effectué une analyse fonctionnelle de la protéine portant des mutations ponctuelles dans le domaine CSH3. Ce travail met en évidence que la mutation ponctuelle d'un résidu spécifique dans le domaine CSH3 active la capacité transformante de Vav1. La transformation par Vav1 met en jeu l'activation de la voie Rac/JNK, le remodelage du cytosquelette et la modulation des fonctions de la protéine d'adhésion β -caténine. Une modulation de la β -caténine est également retrouvée dans des cellules tumorales humaines exprimant de manière ectopique la protéine Vav1. Notre étude démontre ainsi le rôle critique du domaine CSH3 dans la transformation associée à Vav1 et la participation de Vav1 au complexe d'adhésion dans les cellules non hématopoïétiques.

Mots clés : Proto-oncogène, Vav, Transformation cellulaire, Jonction d'Adhérence, Caténine, Cytosquelette, Adaptateur

Abstract :

GTPases are critical modulators of cell migration and adhesion and play a pivotal role in the acquisition of tumorigenic properties by transformed cells. GTPases functions are tightly regulated by specific proteins such as Guanosine Exchange Factors (GEF). Among them, the proto-oncogene Vav1 has a strict haematopoietic lineage expression. Deletion of the amino-terminal regulatory domain of Vav1 generates a truncated form able to transform NIH3T3 fibroblasts. This transforming capacity is linked to a constitutive exchange function towards Rho family GTPases. Vav1 exhibits also three Src Homology domains (NSH3-SH2-CSSH3) that mediate protein-protein interactions. These domains allow Vav1 to function as an adaptor protein. In order to delineate the contribution of these domains to Vav1 transforming capacity, we performed functional analysis of CSH3-mutated proteins. Our study demonstrates that mutation of a specific residue within the CSH3 domain of Vav1 activates its transforming capacity. Vav1 induced transformation involve the activation of a Rac/JNK pathway that lead to cytoskeleton remodelling and to the modulation of the functions of β -catenin a critical component of adherence junctions. We further confirmed this modulation of β -catenin functions in human cancer cells that ectopically express Vav1. Our analysis highlights the pivotal role of the CSH3 domain in Vav1-mediated transformation and reveals the participation of Vav1 to adherence complexes in non-hematopoietic cells.

Key words: Proto-oncogene, Vav, Cell Transformation, Adherence Junction, Catenin, Cytoskeleton, Adaptor