

Table des matières

RÉSUMÉ	iii
ABSTRACT	iv
TABLE DES MATIÈRES.....	v
LISTE DES FIGURES.....	ix
LISTE DES TABLEAUX	x
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	xi
REMERCIEMENTS	xv
1. CHAPITRE 1 : INTRODUCTION.....	1
 1.1. La protéine adaptatrice GRB2 présente un rôle central dans les réseaux de signalisation cellulaire	1
1.1.1. Découverte de GRB2 et de son rôle d'adaptateur dans la signalisation cellulaire	4
1.1.2. Structure modulaire de la protéine adaptatrice GRB2	6
1.1.3. Les protéines adaptatrices sont au cœur des réseaux de signalisation cellulaire	18
1.1.4. Fonctions de GRB2 dans la signalisation cellulaire	22
1.1.5. GRB2 joue un rôle clé dans le développement embryonnaire	30
 1.2. HER2 est un RTK au fonctionnement atypique	33
1.2.1. Modes d'activation des RTK.....	34
1.2.2. Fonctions physiologiques de HER2	41
 1.3. Le cancer du sein HER2+	43
1.3.1. Découverte de l'oncogène HER2	43
1.3.2. Pertinence clinique de la classification des cancers du sein.....	44
1.3.3. Modèles d'étude du cancer du sein	48
1.3.4. Mécanismes d'activation de HER2 dans le cancer mammaire	55
1.3.5. Signalisation pro-tumorale induite par HER2	57
1.3.6. Inhibiteurs de HER2 : mécanismes d'action et de résistance.....	63
1.3.7. Rôle de GRB2 dans le cancer du sein HER2+	66

1.4. La glycoprotéine membranaire MPZL1, nouvel acteur signalétique dans la glande mammaire	71
1.4.1. Structure de MPZL1	71
1.4.2. Fonctions signalétiques connues de MPZL1	74
1.4.3. Implication de MPZL1 dans la progression tumorale	77
1.5. Hypothèse et objectifs.....	78
2.CHAPITRE 2 : MPZL1 FORMS A SIGNALLING COMPLEX WITH GRB2 ADAPTOR AND PTPN11 PHOSPHATASE IN HER2-POSITIVE BREAST CANCER CELLS	79
2.1. Avant-propos.....	80
2.2. Résumé.....	81
2.3. Abstract	82
2.4. Introduction	83
2.5. Results.....	84
2.5.1. Protein interaction network mapping in HER2+ breast cancer cells reveals new GRB2 binding partners	84
2.5.2. MPZL1 associates with GRB2 in a pTyr, PTPN11-dependent manner.....	86
2.5.3. MPZL1-PTPN11-GRB2 complex formation is regulated by cell adhesion on fibronectin	88
2.6. Discussion	90
2.7. Methods	92
2.7.1. Constructs.....	92
2.7.2. Cell culture and transfection	92
2.7.3. Cell adhesion on fibronectin	93
2.7.4. Cell lysis and affinity purification.....	93
2.7.5. Western Blotting and antibodies	94
2.7.6. Immunofluorescence	94
2.7.7. Mass spectrometry sample preparation and analysis	95
2.8. References.....	96

3.CHAPITRE 3 : ANALYSE PROTÉOMIQUE DES MODIFICATIONS DANS LES RÉSEAUX D'INTERACTION DE GRB2 DANS DES MODÈLES DE PROGRESSION TUMORALE DU CANCER DU SEIN HER2+.....	101
3.1. Les réseaux de GRB2 sont modifiés par le traitement au TGFβ dans un modèle de transition épithélio-mésenchymateuse <i>in vitro</i>	102
3.1.1. Établissement d'un modèle de transition épithélio-mésenchymateuse compatible avec les analyses de MS.....	103
3.1.2. Analyse protéomique des réseaux de signalisation dépendants de GRB2 dans le modèle de transition épithélio-mésenchymateuse <i>in vitro</i>	106
3.2. Les interactions de GRB2 avec ses partenaires sont modifiées lors de xénogreffes orthotopiques chez la souris	109
3.2.1. Mise au point du modèle de progression tumorale <i>in vivo</i>	110
3.2.2. Analyse protéomique des modulations dans les réseaux de GRB2 après xénogreffes orthotopiques chez la souris.....	114
3.3. Discussion	117
3.4. Matériel et méthodes	123
3.4.1. Constructions.....	123
3.4.2. Culture cellulaire	123
3.4.3. Traitement au TGFβ	123
3.4.4. Xénogreffes chez la souris	124
3.4.5. Établissement de lignées cellulaires à partir de tumeurs primaires chez la souris	124
3.4.6. Immunopurifications	124
3.4.7. Western blot et anticorps.....	125
3.4.8. Immunofluorescence	125
3.4.9. Analyses de spectrométrie de masse	126
4CHAPITRE 4 : DISCUSSION GÉNÉRALE ET CONCLUSIONS	128
4.1 Les réseaux d'interaction de GRB2 présentent des modifications dans le cancer du sein HER2+	128
4.1.1 Les réseaux signalétiques de GRB2 incluent six nouveaux partenaires dans des cellules de cancer du sein HER2+	128
4.1.2 Des interactions de GRB2 régulées par phosphorylation sont favorisées dans des cellules de cancer du sein HER2+	133

4.2	Un nouveau complexe constitué de MPZL1, PTPN11 et GRB2 a été identifié dans des cellules de cancer du sein HER2+.....	134
4.3	Les réseaux signalétiques de GRB2 sont modulés dans des modèles de progression tumorale.....	138
4.3.1	GRB2 interagit avec de nouveaux interacteurs dans deux modèles de progression tumorale	139
4.3.2	Les réseaux signalétiques de GRB2 présentent des modulations d'interaction dans deux modèles de progression tumorale.....	140
4.4	Les interactions de GRB2 identifiées suggèrent que la surexpression de HER2 induit des modifications dans les réseaux signalétiques dépendants de GRB2	142
4.5	Conclusion générale.....	144
BIBLIOGRAPHIE DES CHAPITRES 1, 3 ET 4.....		146
ANNEXE : SAMPLE PREPARATION FOR MASS SPECTROMETRY ANALYSIS OF PROTEIN-PROTEIN INTERACTIONS IN CANCER CELL LINES AND TISSUES.....		195

Liste des figures

Figure 1.1 : Principales caractéristiques des différentes protéines effectrices proximales en aval des récepteurs tyrosine kinases (RTK)	2
Figure 1.2 : Les protéines adaptatrices présentent une architecture modulaire.....	3
Figure 1.3 : Représentation graphique du domaine SH2 de GRB2.....	9
Figure 1.4 : Logo de l'alignement des séquences des domaines SH2.....	10
Figure 1.5 : GRB2 est une protéine adaptatrice modulaire	12
Figure 1.6 : Logo de l'alignement des séquences des domaines SH3.....	15
Figure 1.7 : La protéine adaptatrice GRB2 appartient au processus central du système de signalisation cellulaire	18
Figure 1.8 : L'activité du domaine kinase des RTK est régulée par la dimérisation.....	36
Figure 1.9 : Les 4 membres de la famille de RTK HER présentent une architecture similaire et sont capables d'homo- et d'hétérodimérisation.....	38
Figure 1.10 : Le récepteur HER2 présente 5 sites d'autophosphorylation participant à son action oncogénique	58
Figure 1.11 : Structure de la protéine MPZL1 et de ses isoformes.	72
Figure 1.12 : Interactions et fonctions cellulaires connues de MPZL1	75
Figure 2.1 : Protein interaction network mapping in HCC1954 HER2+ cells reveals new GRB2 binding partners.....	85
Figure 2.2 : GRB2 associates with MPZL1 in a phosphotyrosine, SH2 domain-dependent manner.....	86
Figure 2.3 : The tyrosine phosphatase PTPN11 is required as a scaffold for the GRB2/MPZL1 interaction.	87
Figure 2.4 : Cell adhesion on fibronectin triggers GRB2-MPZL1 complex formation at the plasma membrane	89
Figure 3.1 : Détermination de la séquence optimale de traitement au TGF β pour modéliser la transition épithélio-mésenchymateuse.....	105
Figure 3.2 : Les interactions des réseaux de signalisation de GRB2 sont modifiées par le traitement au TGF β mimant la transition épithélio-mésenchymateuse in vitro.	107
Figure 3.3 : Analyse de la pénétrance des xénogreffes orthotopiques de cellules HCC1954 chez des souris immuno-déficientes.	111
Figure 3.4 : Les lignées extraites des tumeurs mammaires formées par xénogreffes orthotopiques chez la souris immuno-déficiente présentent des niveaux d'expression des transgènes hétérogènes.	113
Figure 3.5 : Les interactions de GRB2 dans les deux lignées extraites de tumeurs établies chez la souris sont modifiées comparativement à la lignée injectée.	117
Figure Annexe 1 : Spin tip-based protein digestion setup.	202

Liste des tableaux

Tableau 1.1 : Les 4 classes principales de cancer du sein et l'expression de certains récepteurs au sein de ces classes.....	47
Tableau 1.2 : Tableau récapitulatif des traitements ciblés de HER2 approuvés dans le traitement du cancer du sein HER2+.....	63

Liste des abréviations

- ADAM12 : *A Disintegrin And Metalloproteinase domain-containing protein 12*
ADCC : *Antibody-Dependant Cell-mediated Cytotoxicity*
ADN : Acide DésoxyriboNucléique
AP : *Affinity Purification*
AP1 : *Activator Protein 1*
AP2 : *Activator Protein 2*
AP-MS : *Affinity Purification-Mass Spectrometry*
AREG : Amphiréguline
ARHGEF35 : *RHo Guanine Exchange Factor 5*
ARHGEF5 : *RHo Guanine Exchange Factor 35*
ARN : Acide ribonucléique
ASH : *Abundant SRC Homology*
BCa : *Breast CAncer*
BCR/ABL : *Breakpoint Cluster Region protein/ABeLson tyrosine-protein kinase fusion protein*
BKS : *Breast tumor kinase substrate*
BOSS : *Bride Of Sevenless*
BRK : *BReast tumor Kinase*
CIRBP : *Cold-inducible RNA-binding protein*
CRK : *C T10 Regulator of a tyrosine Kinase.*
CRKL : *Crk-like protein*
CTTN : Cortactine
DCIS : DuctoCarcinome In situ
DNM2 : Dynamine 2
DRK : *Downstream of Receptor Kinase*
DTK : Domaine Tyrosine Kinase
EGF : *Epidermal Growth Facto*
EGFR : *Epidermal Growth Factor Receptor*
EGR2 : *Early growth response protein 2*
ELK1 : *ETS domain-containing protein Elk-1*
EPH : *Ephrin receptor*
ER : *Estrogen Receptors*
ERBB : *Erythoblastoma protein B*
ERK : *Extracellular signal-regulated kinase*
ERRFI1 : *ERBB receptor feedback inhibitor 1*
ES : *Embryonic Stem cells*
ESR1/2 : *EStrogen Receptor 1/ EStrogen Receptor 2*
FAK : *Focal Adhesion Kinase*
Fbn : Fibronectine
FcγRIIB : *Fc gamma Receptor IIB*
FGF : *Fibroblast Growth Factor*
FGFR : *Fibroblast Growth Factor Receptor*
FISH : *Fluorescent In Situ Hybridization*

FRS1/2 : *Fibroblast growth factor Receptor Substrate 1/2*
GAB1 : *GRB2-associated-binding protein 1*
GAREM : *GRB2-associated and regulator of MAPK protein*
GRB2 : *Growth factor receptor-bound protein 2*
GRB7 : *Growth factor receptor-bound protein 7*
HCC1954 : *Human Carcinoma Cells 1954*
HER : *Human Epidermal Receptor*
HF : *Histone-Fold domain*
HR : *Hormone Receptors*
IDC : *Invasive Ductal Carcinoma*
IGFBP3 : *Insulin-like growth factor-binding protein 3*
IGFR : *Insulin-like Growth Factor Receptor*
IHC : *ImmunoHistoChimie*
ILC : *Invasive Lobular Carcinoma*
IP : *Immuno-purification*
IR : *Insulin Receptor*
IRS1/2 : *Insulin Receptor Substrate 1/2*
ITC : *Isothermal Titration Calorimetry*
ITIM : *Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibitory motif*
JAK2 : *JAnus Kinase 2*
KRT7 : *Kératine 7*
LCIS : *LobuloCarcinome In Situ*
LEPR : *Leptin Receptor*
LET23 : *LEThal protein 23*
LET60 : *LEThal protein 60*
LMO7 : *LIM domain Only protein 7*
LPCAT1 : *LysoPhosphatidylCholine AcylTransferase 1*
MAPK : *Mitogen-Activated Protein Kinase*
MISP : *Mitotic Interactor and Substrate of PLK1*
MMP : *Matrix MetalloProteases*
MP1 : *MEK-binding Partner 1*
MPZL1 : *Myelin protein zero-like protein 1*
MUC1 : *Mucine 1*
MUC4 : *Mucine 4*
MVP : *Major Vault Protein*
MYD88 : *Myeloid differentiation primary response protein 88*
NCK1/2 : *Non-Catalytic region of tyrosine Kinase adaptor protein1/2*
NEU : *NEUroblastoma inducing protein*
NK : *Natural Killer*
NMuMG : *Normal Murine Mammary Gland cells*
NRG : *Neuréguline*
N-WASP : *Neural Wiskott-Aldrich syndrome Protein*
NYPD : *Neu tYrosine Phosphorylation Deficient*
ORP3 : *Oxysterol-binding protein-Related Protein 3*
PAK1 : *p21-activated kinase 1*
PCBP2 : *Poly rC-binding protein 2*
PDGFR : *Platelet Derived Growth Factor Receptor*

PH : *Pleckstrin Homology*
PI3K : *PhosphatidylInositol 3-Kinase*
PI3KCA/B : *PhosphatidylInositol 3-Kinase Catalytic subunit A/B*
PI3KR1/2 : *PhosphatidylInositol 3-Kinase Regulatory subunit 1/2*
PIP : PhosphatidylInositol Phosphate
PIP2 : PhosphatidylInositol 4,5-biPhosphate
PIP3 : PhosphatidylInositol 3,4,5-triPhosphate
PR : *Progesterone Receptor*
PRKCD : *Protein Kinase C Delta type*
PRL : Prolactine
PRLR : *Prolactine Receptor*
PTB : *PhosphoTyrosine-Binding*
PTEN : *Phosphatase and TENsin homolog*
PTK6 : *Protein-tyrosine kinase 6*
PTPN11 : *Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 11*
PTPN6 : *Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 6*
PTPRA : *Receptor-type tyrosine-protein phosphatase alpha*
PTPRE : *Receptor-type tyrosine-protein phosphatase epsilon*
PV : Pervanadate
PZR : *Protein Zero Related*
RAC1 : *Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1*
RAS : *Rous Avian Sarcoma*
RHO : *Ras HOMologs*
RMN : Résonnance Magnétique Nucléaire
RTK : Récepteur Tyrosine Kinase
SEM-5 : *SEx Muscle abnormal 5*
SEV : *Sevenless*
SFN : Stratifine
SH2 : *Src Homology 2*
SH3 : *Src Homology 3*
SHC1 : *SH2 domain protein C1*
SIRP α : *Signal-regulatory protein alpha*
SOS : *Son Of Sevenless*
SPRY1/2 : Sprouty 1/2
SRC : *SaRComa (Schmidt–Ruppin A-2) viral oncogene homolog (avian)*
SRM : *Selected reaction monitoring*
STAP2 : *Signal-transducing adaptor protein 2*
STAT : *Signal transducer and activator of transcription*
SWATH : *Sequential Window Acquisition of all Theoretical spectra*
TACE : *Tumor necrosis factor Alpha Converting Enzyme*
TbRII : *Transforming Growth Factor Receptor II*
TGF α : *Transforming Growth Factor alpha*
TGF β : *Transforming Growth Factor beta*
TIE2 : *Tyrosine kinase with Ig and EGF homology domains*
TIM : *Transforming Immortalized Mammary oncogene*
TLR : *Toll-Like Receptor*

TN : Triple Négatif

TP63 : *Tumor Protein 63*

TUBB3 : *Tubulin beta-3 chain*

VAMP : *Vesicle-associated membrane protein*

VAPA : *Vesicle-associated membrane protein-associated protein A*

VAPB : *Vesicle-associated membrane protein-associated protein B*

VAV2 : *A guanine nucleotide exchange factor*

VEGF : *Vascular Endothelial Growth Factor*

VEGFR : *Vascular Endothelial Growth Factor Receptor*

WIPF2 : *WAS/WASL-Interacting Protein Family member 2*

WNT : *WiNgless-Type MMTV integration site family*

YWHAB : *14-3-3 protein beta/alpha*

YWHAQ : *14-3-3 protein theta*

YWHAZ : *14-3-3 protein zeta/delta*

ZAP70 : *70 kDa Zeta-chain Associated Protein*

Remerciements

Tout d'abord, j'aimerais remercier mon directeur de recherche, le Dr Nicolas Bisson, pour m'avoir donné l'opportunité d'effectuer mon doctorat dans son laboratoire. Ces quatre années bien remplies m'ont permis de me développer d'un point de vue scientifique mais également en tant que personne. Je te remercie de la liberté que tu m'as accordée, et de ton soutien dans la poursuite de mes recherches. Merci pour toutes les opportunités qui m'ont été offertes en travaillant dans ton laboratoire. Je tiens aussi à te remercier de t'être toujours soucié de nous et de notre avenir autant en tant que directeur de laboratoire qu'en tant que mentor.

J'aimerais également remercier chaleureusement mes collègues, pour votre bonne humeur, votre humour à toute épreuve et votre solidarité. Je suis très reconnaissante d'avoir pu travailler avec une équipe aussi soudée, où les accomplissements de chacun font la fierté de tous. Je tiens à remercier notre professionnel de recherche préféré, l'inimitable Dr François Chartier. Merci de toujours trouver du temps pour nous, pour tes réponses aux questions mêmes les plus bizarres, tes idées de génie, et pour tout le reste. Ugo, merci pour ton aide à mes débuts, pour tes playlists, et pour ton humour débordant! Sara, thanks for all the English/French/Polish conversations, I already miss our breaks! Noémie, je n'ai pas eu le temps d'assez profiter de ta présence dans le lab à mon goût, je te souhaite de belles années ici, avec le meilleur pipetboy du lab! Merci pour ta présence ces derniers mois, et pour ton obsession presqu'à la hauteur de la mienne pour Despacito en culture cellulaire. Et Lauriane, merci pour ton support inconditionnel, tes innombrables relectures, ta capacité à remotiver quelqu'un peu importe la situation... Je m'arrêterai ici mais la liste est longue, si je suis arrivée jusqu'ici, c'est à tes côtés! Merci à vous d'avoir été d'aussi agréables collègues, ces quatre années sont passées très vite à vos cotés. Je tiens aussi à remercier Maxime Coté, notre PPR d'adoption, pour toutes tes blagues et tes conseils de grand!

J'aimerais remercier également notre belle gang, Alexandra, Aksam, Claire, Alice, Carole, Manue, Mathieu, Gaëlle, Mélany, Imène, Khalid, JC, Lauriane, Niraj et les petits nouveaux Max, Phil, Cornélia et Myriam, vous êtes une famille en or loin des siens! Vous avez toujours été là pour célébrer les réussites, et pour arroser les moments moins brillants! Merci d'être vous, et d'être là, chacune de ces rencontres rend ce passage à Québec une expérience

inoubliable. Niraj, thanks for all your insider tips, your good spirits and your dance moves! Un grand merci à mes ppf, Lauriane, Imène et Carole, vous êtes des amies vraiment hors du commun. Merci pour vos relectures, vos répétitions (parfois forcées mais toujours utiles!), vos discussions scientifiques ou non, aucun problème ne résiste à un gand conseil de ppf! Je ne vous remercierai jamais assez d'avoir été là tout au long de cette vallée!

Je tiens bien sûr à remercier Laurent, pour son soutien inébranlable, pour sa patience, et pour ses petits plats réconforts! Merci d'avoir toujours cru en moi, merci de m'avoir accompagnée dans cette expérience. Merci de toujours t'intéresser à tout et n'importe quoi, et de m'entraîner dans ton optimisme et tes aventures!

Merci à mes parents, Thierry et Karine, d'avoir cultivé ma curiosité dès mon plus jeune âge, de m'avoir soutenue pendant mes (longues) études, et pour m'avoir appris que les échecs ne sont que des occasions de mieux faire la fois suivante. Merci à mes frères, Octave et Arthur, partenaires de mes premières « expériences scientifiques », ailes de guêpe et bleu de méthylène à l'appui! Je tiens également à remercier ma grand-mère Nicole, pour m'avoir partagé sa philosophie, son dynamisme et son optimisme. Merci aussi à la famille québécoise, les Igonène et les Chabot, pour votre accueil chaleureux, qui rajoute définitivement de grands moments à notre expérience du Québec!

J'aimerais également remercier les membres de mon comité de suivi, la Dre J.N. Lavoie, les Drs P. Laprise et C. Landry, pour leurs conseils scientifiques tout au long de mon doctorat, qui m'ont grandement aidé dans sa réalisation.

Je tiens aussi à remercier la plateforme de protéomique du CHUL chez qui toutes les analyses de MS présentées ici ont été effectuées. Merci à Florence Roux-Dalvai d'être toujours disponible pour nos questions.

Enfin, je souhaite remercier les membres de mon jury d'avoir accepté d'évaluer mon travail.

1. Chapitre 1 : Introduction

Mon projet de doctorat s'intéresse aux réseaux de signalisation de la protéine adaptatrice GRB2 dans le cancer du sein HER2+. Afin d'aborder les thèmes importants à ce contexte, l'introduction sera divisée en quatre sections : la protéine adaptatrice GRB2 et son rôle dans la signalisation cellulaire, le récepteur tyrosine kinase (RTK) HER2 et sa régulation, le cancer du sein HER2+ et le rôle de HER2 et GRB2 dans ce processus oncogénique, et enfin, la glycoprotéine membranaire MPZL1 et son implication dans la signalisation cellulaire.

1.1. La protéine adaptatrice GRB2 présente un rôle central dans les réseaux de signalisation cellulaire

Les protéines adaptatrices sont de petites protéines constituées exclusivement de domaines d'interaction protéine-protéine et de motifs de liaison (Koch et al., 1991). Elles peuvent interagir avec différentes combinaisons de récepteurs et d'effecteurs cytoplasmiques. Elles se distinguent des protéines d'échafaudage, d'arrimage et autres protéines effectrices proximales par l'absence d'activité catalytique, de site majeur de phosphorylation sur tyrosine, et de séquence de ciblage à la membrane ainsi que par leur taille relativement restreinte (Fig. 1.1) (Brummer et al., 2010; Pawson and Scott, 1997). En effet, selon la définition des protéines d'arrimage, ces dernières peuvent être recrutées aux RTK activés via un domaine de reconnaissance de résidus tyrosines phosphorylés, tel que les domaines SH2 (*SRC Homology domain 2*) ou PTB (*PhosphoTyrosine-Binding*). Les protéines d'arrimage peuvent alternativement être recrutées via des interactions avec des protéines adaptatrices. Leur localisation membranaire est de plus stabilisée par leur association aux phospholipides de la membrane plasmique via des régions spécifiques, telles que le domaine PH (*Pleckstrin Homology*), par exemple. Cette classe de protéines présente également des régions très riches en tyrosines qui seront alors phosphorylées, généralement par le RTK associé. Ceci conduit au recrutement de nouvelles protéines effectrices via des domaines SH2 ou PTB, permettant non seulement d'amplifier le signal transmis par les RTK mais également d'augmenter la diversité des effecteurs recrutés (Brummer et al., 2010).

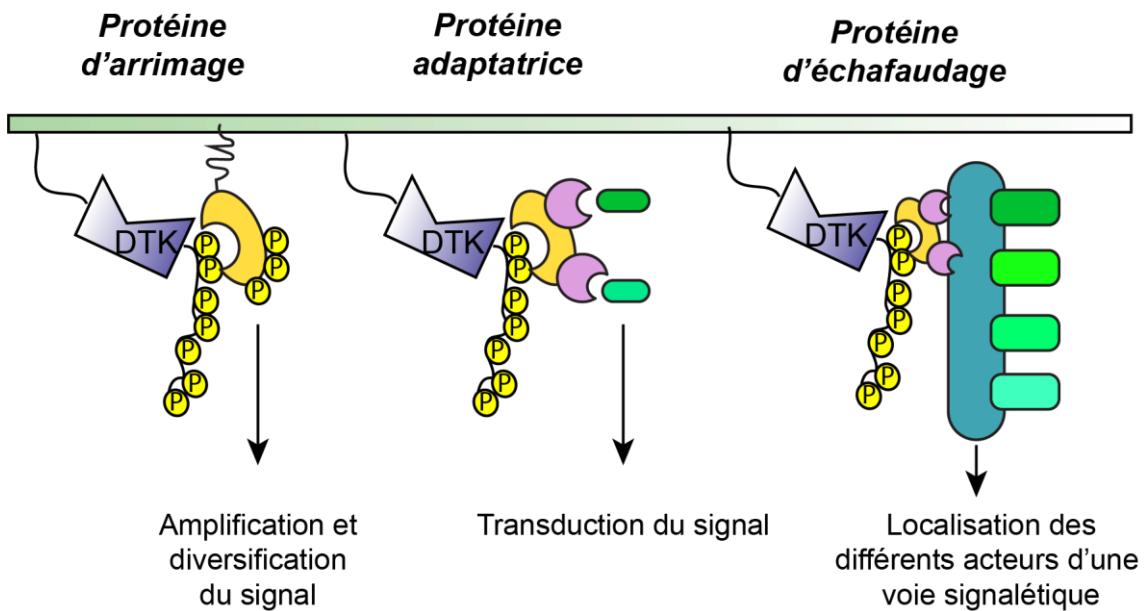


Figure 1.1 : Principales caractéristiques des différentes protéines effectrices proximales en aval des récepteurs tyrosine kinases (RTK).

Les protéines d'arrimage, telles que FRS1/2 et IRS1/2, présentent généralement un domaine de reconnaissance des résidus tyrosine phosphorylés (P) de type SH2 ou PTB, ainsi qu'une séquence d'adressage à la membrane. Ces protéines sont classiquement phosphorylées par le domaine tyrosine kinase des RTK (DTK), créant ainsi de nouveaux sites de recrutement pour des protéines effectrices. Les protéines d'arrimage jouent ainsi un rôle d'amplification et de diversification du signal. Les protéines adaptatrices à domaines SH2-SH3 sont constituées d'un seul domaine SH2 associé à plusieurs domaines SH3. Cette combinaison modulaire leur confère un rôle de nucléateur de complexes signalétiques, permettant le recrutement de nombreuses protéines effectrices. Les protéines d'échafaudage, telles que les protéines 14-3-3, permettent de créer des plateformes stabilisant différentes protéines effectrices, comme par exemple des enzymes d'une même voie de signalisation.

Les protéines d'échafaudage sont quant à elles définies par l'association de nombreux domaines d'interaction protéine-protéine, protéine-phospholipides et de motifs de liaison, et sont ainsi généralement de plus grande taille (Burack and Shaw, 2000; Ferrell, 2000). Leur rôle principal est d'ancrer leurs partenaires afin de stabiliser les interactions kinase/substrat par exemple, et elles sont généralement situées plus distalement des RTK dans la signalisation, comme la protéine de levure Ste5 ou LAMTOR3 (Burack and Shaw, 2000).

Enfin, les protéines adaptatrices sont définies par leur capacité à interagir directement avec des RTK activés via un domaine SH2, ou indirectement via des protéines d'arrimage ou d'autres classes de protéines. Les protéines adaptatrices sont également caractérisées par leur capacité à coupler ce signal au recrutement d'effecteurs cytoplasmiques, généralement via

des domaines SH3 (*SRC Homology domain 3*) (Koch et al., 1991; Pawson and Scott, 1997). Leur rôle général est ainsi de convertir le signal de phosphorylation transmis par les RTK (signal entrant) en un signal sortant spécifique, tel que l'activation de la voie ERK (Pawson and Scott, 1997). On peut mentionner le recrutement de PAK1 au PDGFR activé, via le deuxième domaine SH3 de NCK1/2 liant la kinase effectrice, et le domaine SH2 de cette protéine adaptatrice assurant la liaison au RTK (Bokoch et al., 1996; Galisteo et al., 1996), ou encore le recrutement membranaire de SOS1 à EGFR activé, via l'interaction du domaine SH2 et d'un des domaines SH3 de GRB2 au RTK et à la GTPase respectivement (Buday and Downward, 1993). Il est cependant important de noter la discordance entre les définitions de chaque classe de protéines selon les auteurs, nous nous intéresserons ici plus particulièrement aux protéines adaptatrices à domaines SH2 et SH3, telles que CRK, NCK1/2 ou GRB2 (Fig. 1.2) (Koch et al., 1991).

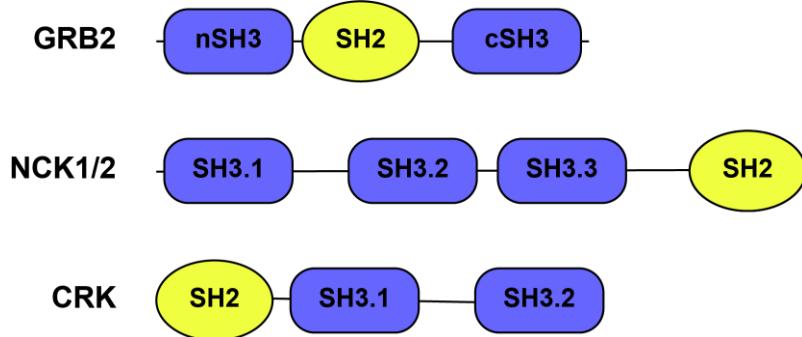


Figure 1.2 : Les protéines adaptatrices présentent une architecture modulaire.

Les protéines adaptatrices à domaine SH2/SH3, GRB2, NCK1/2 et CRK caractérisées chez l'humain sont constituées de l'association modulaire d'un seul domaine SH2 (jaune) et plusieurs domaines SH3 (bleu). Les domaines SH3 de GRB2 sont nommés nSH3 ou cSH3 en fonction de leur position relative au domaine SH2, tandis que les domaines SH3 de NCK1, NCK2 et CRK sont notés SH3.1, SH3.2 ou SH3.3 en fonction de leur position relative à l'extrémité N-terminale de la protéine.

Les protéines adaptatrices sont effectivement constituées en général d'un domaine SH2 et de plusieurs domaines SH3, qui leur permettent d'interagir avec des effecteurs cytoplasmiques via des régions riches en prolines, arginines, et lysines. Elles sont caractérisées par une petite taille, généralement inférieure à celle des protéines d'échafaudage, ainsi que l'absence de région riche en tyrosines phosphorylées par les RTK

et de séquences d'adressage à la membrane plasmique à l'instar des protéines d'arrimage (Brummer et al., 2010; Pawson, 2007). Cependant, une étude récente a démontré que les domaines SH2 du génome humain, et ainsi les protéines adaptatrices à domaines SH2/SH3, possèdent des capacités de liaison à la membrane, par interaction avec des phosphoinositides, malgré l'absence de séquence de myristoylation ou de domaine PH (Park et al., 2016).

L'assemblage modulaire de domaines SH2 et SH3 permet donc à ces protéines d'assumer leurs fonctions d'adaptateur dans la transduction du signal (Koch et al., 1991; Pawson and Scott, 1997).

1.1.1. Découverte de GRB2 et de son rôle d'adaptateur dans la signalisation cellulaire

Le gène codant pour la protéine GRB2 a été cloné pour la première fois en 1991, par l'équipe du Dr Schlessinger (Skolnik et al., 1991). Ces travaux visaient à caractériser des effecteurs proximaux d'EGFR, via une technique de criblage d'une banque d'expression phagique, dénotée CORT (*Cloning Of Receptor Targets*). Les partenaires identifiés ont ainsi été qualifiés de *Growth factor Receptor Bound*, d'où le nom de GRB2. À cette époque, le récepteur EGFR activé était connu pour interagir avec PLC γ et SHC1, via les domaines SH2 de ces dernières (Margolis et al., 1990). De même, il était connu que les protéines PLC γ , SHC1 et SRC soient également recrutées au PDGFR activé (Meisenhelder et al., 1989; Molloy et al., 1989). L'objectif de ces études était ainsi d'identifier de nouvelles molécules capables d'interagir avec des RTK activés via des domaines de reconnaissance des résidus tyrosines phosphorylés tels que les domaines SH2, en vue de caractériser les déterminants moléculaires et les fonctions de ce type d'interactions. Une autre équipe s'intéressant également à la caractérisation de protéines à domaines SH2 a simultanément cloné GRB2, dénommée ASH dans leur étude (pour *Abundant SRC Homology*) à partir d'oligonucléotides spécifiques des domaines SH2 (Matuoka et al., 1992).

Les domaines SH2 étaient suggérés à cette époque appartenir à un mécanisme général de couplage du signal entre la phosphorylation des RTK lors de leur activation et l'activation de différentes enzymes et protéines régulatrices (Lowenstein et al., 1992). La présence de domaines SH3 en partenariat avec les domaines SH2 dans la structure de nombreuses

protéines à domaine SH2 alors identifiées avait été relevée par ces travaux. Bien que la fonction de ces domaines SH3 n'ait pas alors été caractérisée, il était proposé que ces derniers soient responsables de la localisation membranaire des protéines les arborant (Skolnik et al., 1991).

Ces études portant sur les interacteurs proximaux des RTK avaient également mis en évidence deux classes majeures pour ces protéines. En premier, les protéines à activité catalytique telles que PLC γ , incluant généralement plusieurs domaines SH2 et un domaine SH3. En second, les protéines dépourvues d'activité catalytique telles que CRK et NCK, présentant généralement dans leur structure un domaine SH2 et différents domaines SH3. La première protéine identifiée par le criblage des CORT, GRB1 (PIK3R1), constitue alors l'unique exception à cette règle, en présentant deux domaines SH2 mais aucune activité catalytique propre (Skolnik et al., 1991). Les membres de la seconde classe de protéines à domaines SH2/SH3 seront plus tard dénommés protéines adaptatrices.

À la différence de GRB2, la surexpression de CRK ou NCK est suffisante à la transformation cellulaire (Chou et al., 1992; Mayer et al., 1988). Malgré l'absence d'activité kinase intrinsèque de CRK, il avait été noté que les niveaux généraux de tyrosines phosphorylées des cellules transformées par v-CRK étaient fortement augmentés, suggérant que cette dernière, et par extension les protéines adaptatrices, permette de réguler les interactions entre kinases et substrats (Matsuda et al., 1990; Mayer and Hanafusa, 1990). Cependant, la transformation de cellules par surexpression de NCK ne conduit pas à une augmentation des niveaux de phosphorylation sur tyrosine, laissant penser à un rôle plus général des protéines à domaine SH2 sans activité catalytique dans la signalisation en aval des RTK que la simple régulation de la phosphorylation par des tyrosine kinases (Chou et al., 1992). Ceci a été confirmé par la caractérisation de GRB2, constituée d'un domaine SH2 flanqué de deux domaines SH3, dépourvue de toute activité catalytique (Lowenstein et al., 1992; Matuoka et al., 1992; Skolnik et al., 1991). L'expression de GRB2, analysée par Northern blot et Western blot, a été montrée être ubiquitaire, et les alignements de séquences ont mis en évidence une homologie entre GRB2 et la protéine du nématode SEM-5 (Lowenstein et al., 1992). Cette dernière étant impliquée dans le développement vulvaire dans la même voie que les orthologues d'EGFR et RAS (LET-23 et LET-60 respectivement), les auteurs ont supposé un rôle de GRB2 dans la régulation de l'activation de RAS en aval

d'EGFR (Clark et al., 1992). Cette hypothèse a pu être validée via l'induction de la mitose de cellules quiescentes par la microinjection concomitante de GRB2 et RAS, tandis que ces deux protéines n'induisaient pas d'effets mitogéniques lorsque microinjectées seules (Lowenstein et al., 1992). De plus, ces travaux ont également mis en évidence la nécessité des domaines SH2 et SH3 fonctionnels pour l'induction de la synthèse d'ADN par GRB2 et RAS, renforçant ainsi l'hypothèse du rôle de médiateur/adaptateur de GRB2 dans l'activation de RAS en aval d'EGFR activé (Lowenstein et al., 1992). Ces premiers travaux ont également déterminé que la protéine adaptatrice interagit directement avec EGFR et PDGFR, mais aucune interaction de cette dernière avec FGFR n'avait pu être mise en évidence à l'époque (Lowenstein et al., 1992).

L'année suivant ces études concernant le rôle de GRB2 dans la signalisation par les RTK, de nombreuses études décrivant le recrutement de SOS par GRB2 en aval d'EGFR et PDGFR activés, l'activation de la voie RAS/MAPK, et l'induction subséquente de la mitose et de la réorganisation du cytosquelette sont parues (Buday and Downward, 1993; Gale et al., 1993; Li et al., 1993; Matuoka et al., 1993; Rozakis-Adcock et al., 1992, 1993), décrivant ainsi pour la première fois l'implication essentielle de GRB2 dans la transduction du signal en aval des RTK.

Une fois le rôle de GRB2 dans la transduction du signal en aval des RTK et l'implication des associations de la protéine adaptatrice dans cette fonction décrits, de nombreuses études se sont intéressées aux déterminants moléculaires de ces interactions, et donc à la structure des protéines adaptatrices et de GRB2.

1.1.2. Structure modulaire de la protéine adaptatrice GRB2

La fonction dans la signalisation des protéines adaptatrices réside dans leur capacité à interagir avec différents partenaires via leurs domaines de liaison protéique SH2 et SH3. La structure et les déterminants structuraux de leur liaison ont donc été l'objet de nombreuses études.

La protéine adaptatrice GRB2 présente un domaine SH2 central, flanqué de deux domaines SH3, dénotés nSH3 et cSH3 par rapport à leur position relative au domaine SH2 (Lowenstein et al., 1992; Matuoka et al., 1992; Skolnik et al., 1991) (Fig. 1.2). Étant donné

le rôle d'adaptateur de GRB2, liant des voies pléiotropiques telles que ERK/MAPK à de nombreux RTK, les interactions de GBR2, leurs régulations, et la relation structure/fonction de GRB2 ont également été les sujets de nombreuses études depuis sa découverte.

1.1.2.1. La modularité des protéines adaptatrices à l'origine de leur fonction signalétique

Les protéines adaptatrices sont généralement constituées de l'association modulaire d'un domaine SH2 et de plusieurs domaines SH3. Cette modularité permet leur interaction avec différentes combinaisons de récepteurs et d'effecteurs cytoplasmiques, assurant ainsi le relais de l'information transmise par les récepteurs. L'association de différents domaines de liaison ainsi que la variation de leur arrangement au sein de chaque protéine adaptatrice permet d'une part de contrôler leur activité physiologique, et d'autre part d'agréer de nouveaux mécanismes de régulation de la signalisation (Pawson and Nash, 2003). En effet, la modularité des protéines à domaines SH2/SH3 permet de réguler leur association avec leurs partenaires. Par exemple, l'association de deux domaines de même classe en tandem permet dans certains cas d'instaurer un effet coopératif dans la liaison d'une protéine à domaine SH2/SH3 à son partenaire tout en augmentant la spécificité de l'interaction, comme pour l'association de la tyrosine kinase ZAP70 ou de la phosphatase PTPN11 à des résidus tyrosine phosphorylés via deux domaines SH2 en tandem (Hatada et al., 1995). Par ailleurs, les protéines adaptatrices, de par leur modularité, peuvent contrôler l'oligomérisation de complexes de signalisation récepteurs-dépendants. Par exemple, l'adaptateur MYD88 permet de coupler le récepteur TLR à ses cibles cytoplasmiques. Cependant, cette protéine adaptatrice facilite également l'oligomérisation du récepteur nécessaire à la transduction du signal, via des interactions homotypiques entre ses domaines d'interactions promouvant sa propre oligomérisation (Jiang et al., 2006). De plus, les propriétés de liaison combinées des protéines adaptatrices, conférées par leur modularité, diversifient leurs fonctions biologiques en leur permettant d'interagir avec différentes combinaisons de récepteurs et d'effecteurs (Lim, 2002; Pawson, 2007). Enfin, l'assemblage modulaire de différents domaines d'interaction permet la détection simultanée de plusieurs signaux entrants. Ces signaux peuvent alors conduire à des effets indépendants, anti-coopératifs ou synergiques, permettant

ainsi l'intégration de différents stimuli cellulaires. Ainsi, l'activation d'une voie de signalisation peut dépendre de la détection simultanée de plusieurs signaux (détection de coïncidence) par une protéine adaptatrice ou un complexe signalétique. Cette détection de coïncidence est à l'origine de la complexité et de la robustesse des systèmes de signalisation chez les organismes multicellulaires, et représente un aspect crucial de l'évolution (Findlay et al., 2013; Lim, 2002; Pawson, 2007). Par exemple, le complexe GRB2/SOS1, conduit à l'activation soutenue de la voie RAS/ERK uniquement lorsque les domaines HF (*Histone-Fold domain*) et PH de SOS1, ainsi que le domaine SH2 de GRB2 sont liés à leurs ligands respectifs. Cette détection de coïncidence permet une régulation spatio-temporelle très fine du développement embryonnaire précoce (Findlay et al., 2013). Les fonctions des protéines adaptatrices, et de GRB2 plus particulièrement, sont ainsi régulées par leur capacité à interagir via leurs domaines d'interaction SH2 et SH3.

1.1.2.2. Les domaines SH2

Les domaines SH2, au nombre de 121 dans le protéome humain, sont composés d'une centaine de résidus (Pawson, 2004; Pawson and Gish, 1992). Ces domaines sont retrouvés dans la structure de nombreuses protéines, telles que des enzymes (SRC, PTPN11) ou encore des protéines adaptatrices comme GRB2, CRK et NCK1/2 (Koch et al., 1991). La structure de ces domaines comprend deux hélices α (α A et α B), ainsi que sept brins β (de β A à β G) (Fig. 1.3). En effet, les domaines SH2 montrent une architecture générale compacte, organisée autour d'un feuillet β antiparallèle composé de cinq brins β (β A, β B, β C, β D, β G). Ce feuillet central délimite deux régions importantes du domaine SH2 : la première, flanquée de l'hélice α A, est impliquée essentiellement dans la reconnaissance du résidu tyrosine phosphorylé (pY). La seconde, flanquée par l'hélice α B et de boucles inter-brins β , est quant à elle responsable de l'interaction du domaine SH2 avec des résidus en aval de la pY. Cette partie du domaine est partiellement fermée par un petit feuillet β constitué des brins D, E et F (Cohen et al., 1995; Eck et al., 1993).

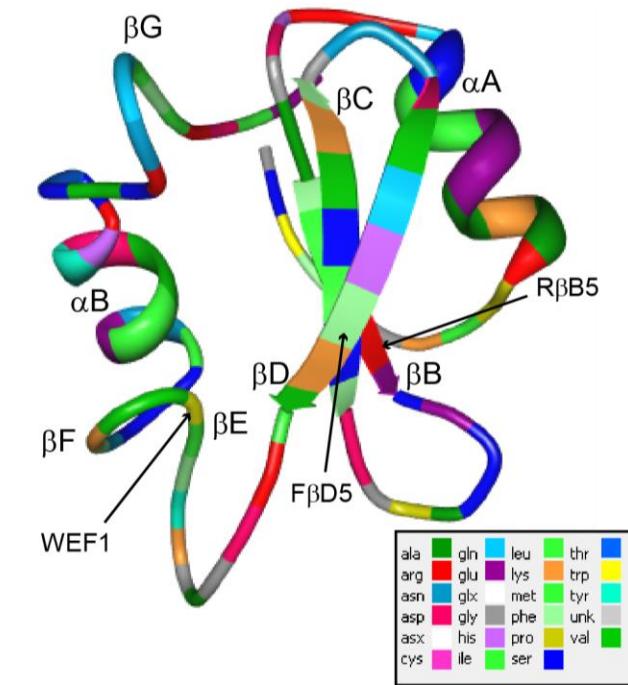


Figure 1.3 : Représentation graphique du domaine SH2 de GRB2.

Les 24 structures du domaine SH2 de GRB2 déterminées par Résonnance Magnétique Nucléaire (RMN) déposées dans Protein Data Bank (PDB) (entrée 1GHU, Thornton et al., 1996) ont été supersposées. La structure 3D résultante a été visualisée avec le logiciel Protein Workshop (Moreland et al., 2005). Chaque résidu est représenté par une couleur. Les hélices α sont représentées par des hélices, les feuillets β par des flèches lorsque leur taille est supérieure à 4 résidus. Les résidus arginine β B5 (R β B5), phénylalanine β D5 (F β D5) et tryptophane EF1 (WEF1) sont indiqués pas des flèches.

D'après des analyses de cristallographie de différents domaines SH2 couplés ou non à leur ligand, le phosphopeptide se lie dans une conformation relâchée et se positionne orthogonalement au feuillet β central. Le ligand ne participe pas à la structure secondaire du domaine SH2 (Eck et al., 1993; Waksman et al., 1992, 1993).

Les travaux portant sur la structure et la spécificité de liaison d'un grand nombre de domaines SH2 ont mis en évidence que la plupart des domaines SH2 affichent le même mode d'interaction avec leurs phosphopeptides cibles, dans lequel des résidus des boucles entre les brins β E et F (boucle EF) et celle entre l'hélice α B et le brin β G (boucle BG) façonnent la poche de liaison au résidu en aval du résidu tyrosine phosphorylé, déterminant ainsi la spécificité de liaison (Kuriyan and Cowburn, 1997). La liaison du domaine SH2 à son ligand lui permet ainsi de reconnaître la phosphotyrosine ainsi que trois à six résidus en aval,

dépendamment de la taille de la poche de liaison du domaine en question. Par exemple, le domaine SH2 de SRC, comme la majorité des domaines SH2, accueille trois résidus en aval de la pY (Songyang et al., 1994), tandis que le domaine SH2 C-terminal de PLC γ 1 en accueille six (Pascal et al., 1994), et ceux de PTPN11 cinq (Case et al., 1994).

La liaison du résidu tyrosine phosphorylé fait intervenir l'hélice α A, les brins β B et β D ainsi que la boucle entre les brins β B et β C. Le brin β D central maintient la structure centrale du résidu phosphotyrosine, tandis que le groupement phosphate s'étend et contacte un résidu arginine du brin β B (β B5) avec lequel il établit des interactions ioniques (Mayer and Baltimore, 1993). Cette interaction est critique à la liaison spécifique du résidu phosphorylé et permet également la discrimination des résidus sérine et thréonine phosphorylés, car les chaînes latérales de ces derniers sont plus courtes et ne permettent pas au groupement phosphate de contacter l'arginine β B5 (Mayer and Baltimore, 1993). Ce résidu est le seul à être conservé dans la grande majorité des domaines SH2 identifiés à ce jour (462/466 (figure 1.4)). Sa mutation abolit totalement l'interaction SH2-phosphopeptide (Mayer and Baltimore, 1993). L'interaction est également stabilisée par des liaisons hydrogène avec le groupement phosphate, ainsi que des interactions hydrophobiques avec les parties aromatiques et aliphatiques de la chaîne latérale du résidu, auxquelles différents résidus des structures secondaires citées ci-dessus participent (Eck et al., 1993; Waksman et al., 1993).

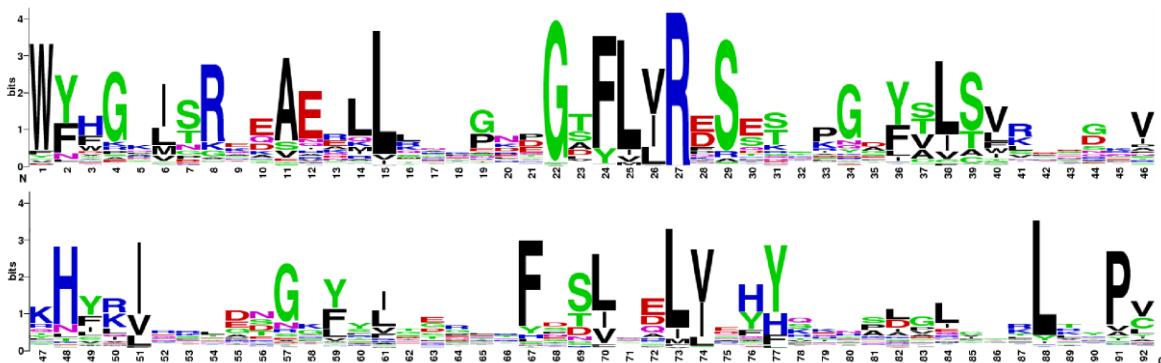


Figure 1.4 : Logo de l'alignement des séquences des domaines SH2.

Les séquences des domaines SH2 identifiés par Prosite dans la banque de données UniprotKB/Swiss-Prot (466) ont été utilisées pour une analyse par alignement multiple (Prosite). Le logo a été généré grâce à l'application WebLogo (Crooks et al., 2004). La hauteur totale de chaque position du logo représente leur degré de conservation. Les colonnes d'alignement très conservées génèrent des positions longues sur le logo. La hauteur de chaque lettre est proportionnelle à la fréquence observée du résidu correspondant à chaque

position de l'alignement multiple (en unité arbitraire). Les lettres de chaque position sont triées de la moins fréquente à la plus fréquente, de façon à ce que la séquence consensus soit lisible en haut du logo (Schneider and Stephens, 1990). L'arginine β B5 se trouve en position 27 du logo, observée à cette position pour 462 des domaines SH2 recensés.

L'étude à grande échelle de la capacité de liaison de phosphopeptides à différents domaines SH2 a permis de caractériser plus précisément les déterminants de la spécificité de liaison de ces domaines. En effet, ces travaux ont montré que les résidus +1 à +3 en aval de la pY dirigent la spécificité de liaison à la majorité des domaines SH2. La nature de ces résidus sur le phosphopeptide corrèle avec la présence de certains résidus dans la structure des domaines de liaison (Songyang and Cantley, 1995; Songyang et al., 1993, 1994). Par exemple, le résidu à la position β D5 du domaine SH2 favorise un résidu polaire lorsque sa nature est aromatique (i.e SRC) ou un résidu hydrophobe lorsqu'il est lui-même hydrophobe (i.e. PLC γ 1) (Songyang et al., 1993). Ainsi, cette étude a proposé de classer les domaines SH2 en groupes de spécificité différentes. Par exemple, les domaines SH2 de type I présentent un résidu aromatique à la position β D5, et interagissent préférentiellement avec des phosphopeptides dont les résidus +1 et +2 sont hydrophiles. À l'inverse, les domaines SH2 de type II présentent une cystéine ou isoleucine à la position β D5, et sélectionnent des phosphopeptides incluant des résidus hydrophobes aux positions +1 et +3 (Songyang et al., 1993).

De façon générale, l'interaction entre le domaine SH2 et la phosphotyrosine permet l'absence de reconnaissance du même peptide non phosphorylé mais n'apporte pas de spécificité de séquence. Les interactions entre le domaine SH2 et les résidus en aval de la phosphotyrosine apportent cette spécificité, mais demeurent de faible affinité, sans quoi le peptide non phosphorylé serait également reconnu par le domaine SH2. L'association de ces deux types d'interactions permet donc aux domaines SH2 de lier des séquences exclusivement après phosphorylation avec une affinité de l'ordre du nM, selon des consensus plus ou moins stricts (Cohen et al., 1995; Cussac et al., 1994; Kuriyan and Cowburn, 1997). Il a en effet été proposé que les domaines SH2 reconnaissent des contextes peptidiques plutôt que des séquences consensus, expliquant la sélectivité de ces domaines bien plus variés que des séquences de liaison consensus (Liu et al., 2010). La séquence de résidus permissifs favorisant la liaison au domaine SH2 et de résidus inhibant la liaison génère un contexte

peptidique local très précis permettant aux domaines SH2 de discriminer leurs ligands de façon très spécifique (Liu et al., 2010, 2012).

Le domaine SH2 de la protéine adaptatrice GRB2 montre une particularité intéressante dans son interaction avec ses phosphopeptides cibles. En effet, le domaine SH2 de GRB2 présente un résidu phénylalanine à la position β D5, l'incluant ainsi dans le groupe de domaine SH2 de type I (Songyang et al., 1993). La présence d'un résidu aromatique à cette position dans la structure secondaire du domaine SH2 induit des interactions de ce dernier avec les résidus +1 et +2 et favorise la liaison à des phosphopeptides présentant des résidus hydrophiles à ces positions (Songyang et al., 1993). Cependant, des analyses d'interaction *in vitro* avec une librairie de phosphopeptides dégénérée ont démontré que les domaines SH2 de GRB2 et de ses orthologues SEM-5 et DRK favorisent grandement des résidus hydrophobes aux positions +1 et +3, rapprochant ainsi ces domaines du groupe II malgré la présence d'un résidu phénylalanine en β D5 (Songyang et al., 1994). Effectivement, ces trois domaines sélectionnent préférentiellement une valine en +1, bien que la forme humaine de GRB2 puisse sélectionner également une glutamine ou d'autres résidus hydrophobes à cette position (Songyang et al., 1994).

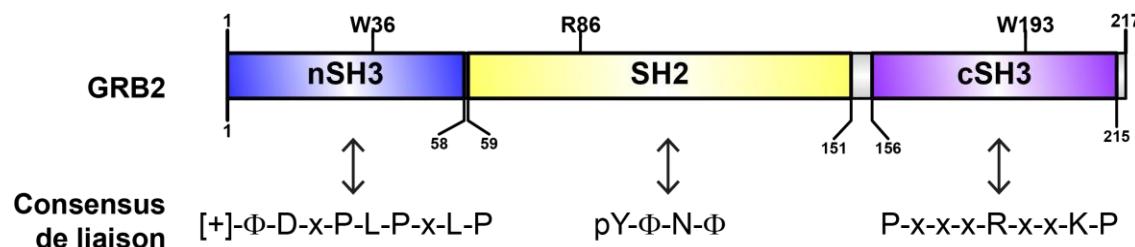


Figure 1.5 : GRB2 est une protéine adaptatrice modulaire

La protéine GRB2 est constituée d'un domaine SH2 central pouvant lier des résidus tyrosine phosphorylés dans la séquence consensus pY-Φ-N-Φ, où Φ représente un résidu hydrophobe. Les domaines SH3 établissent des liaisons avec des régions riches en proline, arginine et lysine, selon la séquence consensus : $[+]-\Phi-D-x-P-L-P-x-L-P$ pour le domaine nSH3 et P-x-x-x-R-x-x-K-P pour le domaine cSH3, où [+], Φ et x représentent respectivement un résidu basique, aromatique ou un résidu quelconque.

Une autre particularité du domaine SH2 de GRB2 réside dans la présence d'un tryptophane en position EF1, bloquant la liaison de la boucle entre les brins β E et β F (boucle EF) au résidu +3 du phosphopeptide, à l'instar des autres domaines SH2 (Fig. 1.3) (Rahuel

et al., 1996). En effet, le tryptophane à cette position cause une protrusion dans la poche hydrophobe se liant au résidu +3, empêchant la liaison du ligand phosphorylé dans une conformation relâchée, et déplace le déterminant de la spécificité de liaison de +3 à +2 (Rahuel et al., 1996). La présence d'une asparagine en position +2 après le résidu phosphotyrosine est ainsi le déterminant fondamental de la spécificité de liaison du domaine SH2 de GRB2, qui a pour séquence de liaison consensus pY-Φ-N-Φ, où Φ représente un résidu hydrophobe (Fig. 1.5) (Songyang et al., 1994). L'importance de l'interaction entre le tryptophane à la position EF1 de GRB2 et l'asparagine de son ligand est telle que la mutation du résidu correspondant du domaine SH2 de SRC (Thr) pour un tryptophane modifie la liaison de ce dernier en le rendant spécifique de ligands du domaine SH2 de GRB2 (Marengere et al., 1994).

Une étude récente a de plus démontré que la majorité des domaines SH2 humains présentent également une forte affinité pour la membrane plasmique, dirigée en majorité par des interactions spécifiques entre des régions cationiques des domaines SH2 en dehors de la surface de liaison au phosphopeptide et des phosphoinositides (PIP) membranaires. Ces travaux ont également mis en évidence que dans certains cas, l'interaction domaine SH2/PIP est essentielle aux fonctions signalétiques de la protéine à domaine SH2 (Park et al., 2016).

Il est très important de noter que toutes ces études de spécificité et d'affinité de liaison ont été effectuées *in vitro*. Ces études sont très pertinentes pour caractériser les déterminants moléculaires dirigeant la spécificité d'interaction des domaines SH2, et de ce fait pour l'étude des interactions régissant la signalisation cellulaire RTK-dépendante. Cependant, *in vivo*, il est fort probable que ces interactions soient régies tout autant par la localisation et l'accessibilité du site de phosphorylation au sein d'une protéine donnée et par la compétition des domaines SH2 présents que par l'affinité intrinsèque d'un domaine SH2 pour un phosphopeptide donné.

1.1.2.3. Les domaines SH3

Les domaines SH3, comptant une cinquantaine de résidus, ne reconnaissent pas une modification post-traductionnelle comme les SH2, mais plutôt des régions riches en proline, lysine, et arginine (Ren et al., 1993). Ces domaines sont constitués de deux petits feuillets β antiparallèles compactés l'un sur l'autre. La résolution des structures de différents complexes SH3/ligand peptidique par résonance magnétique nucléaire (RMN) et cristallographie a mis en évidence que les peptides en complexe avec des domaines SH3 adoptent une conformation en hélice polyproline de type II (PP-II) (Musacchio et al., 1994; Yu et al., 1994). Ce type de structure présente trois boucles symétriques (en coupe transversale), avec un pas d'hélice de trois résidus. Deux des boucles entrent en contact avec des résidus très conservés à la surface du SH3. La spécificité d'interaction de chaque domaine SH3 est attribuée à la symétrie des hélices PP-II, qui peuvent donc interagir avec les domaines SH3 dans deux orientations différentes, notées (+) ou (-) (Yu et al., 1994). Ainsi, les domaines SH3 de PIK3R1 et ABL ont été rapportés pour lier leur cible dans une orientation (+) (Lim et al., 1994a), SRC a été montrée capable d'interagir avec différents ligands via son domaine SH3 dans les deux orientations (Feng et al., 1994), tandis que les deux domaines SH3 de GRB2 interagiraient avec des hélices en orientation (-) (Goudreau et al., 1994; Lim et al., 1994a; Terasawa et al., 1994). L'orientation de l'interaction est déterminée par des interactions neutralisant des charges entre une arginine du peptide (ou une lysine dans le cas exceptionnel de CRK) et des résidus acides du SH3 (Lim et al., 1994a; Wu et al., 1995). Les résidus des deux arêtes de l'hélice en contact avec le SH3 diffèrent en fonction de leur orientation. En effet, l'une d'entre elles ne peut accommoder d'autres chaînes latérales que celle de la proline car cette arête est étroitement plaquée contre la surface du SH3. L'autre arête en contact avec le SH3 interagit avec ce domaine de façon plus lâche, et peut ainsi accommoder d'autres résidus que la proline, tout comme la boucle qui n'entre pas en contact avec le domaine. Ces déterminants structuraux expliquent le motif de liaison général P-x-x-P plus ou moins conservé par la majorité des domaines SH3 (Feng et al., 1994; Wu et al., 1995).

La surface de liaison des domaines SH3 est très restreinte (environ 400\AA^2) et le nombre de liaisons hydrogène qu'elle peut engager est ainsi limité. L'affinité d'interaction de ces domaines avec leur ligand est en conséquence assez faible. De plus, l'importance majeure

d'interactions hydrophobes dans la liaison domaine/ligand restreint leur spécificité intrinsèque. Il est ainsi suggéré que d'autres interactions entre les protéines porteuses de domaine SH3 et leur ligand ainsi que la structure quaternaire de ces deux protéines participent de façon importante à la spécificité de l'interaction (Combs et al., 1996; Feng et al., 1996; Kuriyan and Cowburn, 1997).

Par ailleurs, la forte conservation d'un doublet de tryptophane au sein des domaines SH3 a été observée (Fig. 1.6). Bien que les bases structurales de l'importance de ce doublet n'aient pas été caractérisées, la mutation du premier résidu de ce doublet, qui est très conservé dans les domaines SH3, conduit à la perte d'interaction du domaine SH3 en question, sans affecter la liaison des autres domaines SH2 et SH3 de la protéine ainsi mutée (Tanaka et al., 1995).

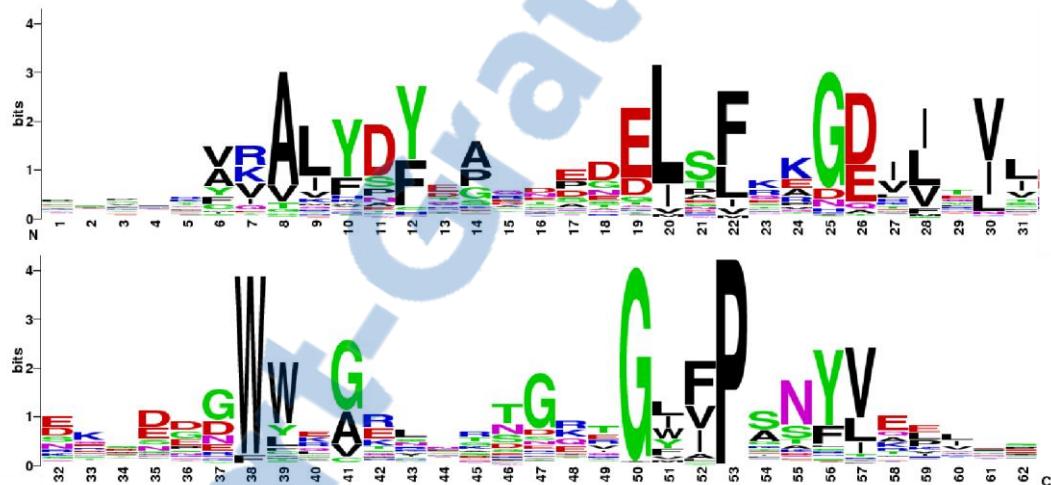


Figure 1.6 : Logo de l'alignement des séquences des domaines SH3.

Les séquences des domaines SH3 identifiés par Prosite dans la banque de données UniprotKB/Swiss-Prot (1130) ont été utilisées pour une analyse par alignement multiple (Prosite). Le logo a été généré grâce à l'application WebLogo (Crooks et al., 2004). La hauteur totale de chaque position du logo représente leur degré de conservation. Les colonnes d'alignement très conservées génèrent des positions hautes sur le logo. La hauteur de chaque lettre est proportionnelle à la fréquence observée du résidu correspondant à chaque position de l'alignement multiple (en unité arbitraire). Les lettres de chaque position sont triées de la moins fréquente à la plus fréquente, de façon à ce que la séquence consensus soit lisible en haut du logo (Schneider and Stephens, 1990). Le doublet de tryptophanes est retrouvé aux positions 38-39.

Les études s'intéressant aux déterminants moléculaires de la liaison des domaines SH3 de GRB2 se sont premièrement concentrées sur le domaine nSH3, partenaire de SOS, pour son

implication alors démontrée dans la transduction du signal. La séquence de liaison de ce domaine a tout d'abord été caractérisée par criblage de banque de phages (*phage display*), utilisant une librairie de peptides constitués de deux prolines fixes espacées de deux résidus variables et entourées de six résidus variables. Ces études ont démontré que le domaine nSH3 de GRB2 favorise la liaison à trois groupes de séquences, dont le consensus global est : [+] - Φ-D-x-P-L-P-x-L-P, où les résidus basiques et aromatiques sont représentés par [+] et Φ, respectivement (Sparks et al., 1996). Cependant, cette même étude a également démontré une divergence importante entre les motifs peptidiques et protéiques sélectionnés par le domaine nSH3 de GRB2 avec la même technique, suggérant que d'autres paramètres soient impliqués dans la spécificité de ce domaine (Sparks et al., 1996).

D'autres études se sont intéressées à muter les résidus du motif P-x-x-P du ligand du domaine nSH3 SOS1 puis à mesurer l'affinité d'interaction avec le domaine nSH3 GBR2 par titrage calorimétrique isotherme (ITC). Ces travaux ont déterminé que la séquence de liaison optimale est P-P-V-P-P-R, et que cette séquence peut également lier le domaine cSH3 de GRB2, bien qu'avec une affinité inférieure (McDonald et al., 2008a). La même équipe a par la suite démontré, toujours par ITC, que les domaines SH3 de GRB2 peuvent lier quatre séquences différentes sur SOS1, avec un consensus de liaison P-x-Ψ-P-x-R, où Ψ représente une valine, leucine ou isoleucine (McDonald et al., 2009). Le résidu Ψ engage des liaisons hydrophobes avec le domaine SH3, tandis que l'arginine établit un pont salin avec celui-ci, et tous deux constituent ainsi des résidus clés dans la liaison SH3/peptide riche en proline (McDonald et al., 2009). Cette étude démontre donc que la séquence consensus de liaison du domaine nSH3 de GRB2 déterminée *in vitro* ne correspond pas exactement à la séquence de liaison de ce domaine à l'un de ses partenaires, soulignant ainsi la divergence entre les motifs protéiques et peptidiques relevée précédemment (Sparks et al., 1996).

De plus, les travaux portant sur l'affinité et la spécificité des domaines SH3 *in vitro* ont décrit la nécessité du motif polyproline P-x-x-P pour la liaison des domaines SH3 (Lim et al., 1994a; Sparks et al., 1996). L'affinité de ces liaisons mesurée *in vitro* par différents travaux est très faible, généralement de 10 à 100 μM (Lim et al., 1994b). Cependant, l'affinité de protéines à domaine SH3 pour leurs ligands riches en prolines est bien supérieure, suggérant ainsi l'implication de régions extérieures au domaine SH3 dans la liaison SH3-ligand (Bartelt et al., 2015; Houtman et al., 2004). Une étude récente s'intéressant à ces

régions a démontré que les motifs P-x-x-P, bien que strictement requis à la liaison des domaines SH3 isolés, ne sont ni suffisants ni nécessaires à la liaison de GRB2 pleine longueur à deux partenaires nSH3-dépendants, SOS1 et CBL, *in vitro* et *in vivo* (Bartelt et al., 2015).

Le domaine cSH3 de GRB2 présente quant à lui un consensus de liaison plus particulier, puisque celui-ci n'inclut pas le motif P-x-x-P (Lewitzky et al., 2001). Des expériences de tests de liaison et de test de compétition *in vitro* ont en effet démontré que la liaison du domaine cSH3 de GRB2 à son ligand fait intervenir une séquence consensus P-x-x-x-R-x-x-K-P (Lewitzky et al., 2001).

La caractérisation des déterminants moléculaires de la liaison des domaines SH3 à leurs ligands, et ceux de GRB2 plus particulièrement, a donc mis en évidence des paramètres nécessaires à la liaison, tels que le doublet de tryptophanes. Cependant, ces études mettent également en avant l'implication d'autres déterminants moléculaires à identifier dans ces interactions. Par exemple, il a été démontré qu'une région inter-domaine des protéines adaptatrices NCK engage des liaisons de faibles affinités pour le ligand du domaine SH3 WASP (Banjade et al., 2015). Cette interaction coopère avec la liaison des domaines SH3 de NCK et promeut la formation d'un complexe multivalent et l'activation de ARP2/3 en aval. La synergie de la liaison des domaines d'interaction tels que les SH3 avec des liaisons de faibles affinités impliquant des régions inter-domaines augmente l'affinité d'interactions protéine-protéine et participe à la formation de complexes signalétiques actifs. Les auteurs suggèrent que cette synergie constitue un mécanisme général pour les protéines multivalentes, telles que les protéines adaptatrices à domaines SH2/SH3 (Banjade et al., 2015; Li et al., 2012).

L'assemblage modulaire des domaines d'interaction protéine-protéine SH2 et SH3 permet ainsi aux protéines adaptatrices de coupler un signal de phosphorylation avec la formation de complexes signalétiques spécifiques (Pawson and Nash, 2003). Les caractéristiques structurales des domaines SH2 et SH3 confèrent à ces domaines des propriétés spécifiques, telles que la reconnaissance de résidus tyrosines phosphorylés pour les domaine SH2 et des régions riches en prolines pour les domaines SH3. De plus, ces domaines présentent également des particularités propres à chacun, qui sont à l'origine de leur spécificité d'interaction, et ainsi de leur rôle dans les réseaux de signalisation cellulaire (Pawson and Nash, 2003).

1.1.3. Les protéines adaptatrices sont au cœur des réseaux de signalisation cellulaire

1.1.3.1. Les protéines adaptatrices participent à la centralisation des réseaux dynamiques de signalisation cellulaire

Grâce à leur structure modulaire, les protéines adaptatrices participent à la détection de coïncidence, permettant ainsi d'augmenter et de contrôler la spécificité et la diversité des réponses cellulaires dans un contexte donné. Les interactions de ces protéines dans un contexte cellulaire s'inscrivent dans un vaste réseau signalétique très complexe. Un des concepts proposés pour la modélisation des réseaux de signalisation cellulaire est le modèle du sablier (Fig. 1.7).

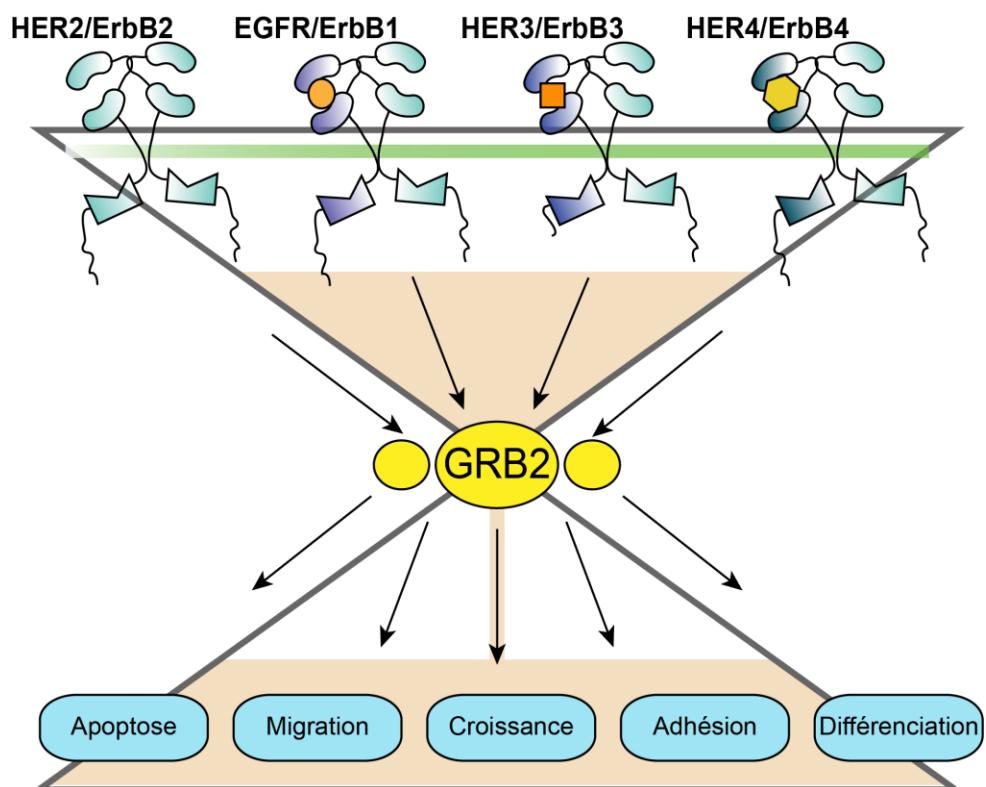


Figure 1.7 : La protéine adaptatrice GRB2 appartient au processus central du système de signalisation cellulaire.

Les stimuli extracellulaires sont perçus et traduits en signaux tels que la phosphorylation par de très nombreux récepteurs, dont les RTK de la famille HER représentés ici. Ces récepteurs

recrutent un nombre limité de protéines effectrices, dont la protéine adaptatrice GRB2. En interagissant avec différents effecteurs, ce nombre limité de protéines effectrices, représenté en jaune, est responsable de la régulation d'un nombre très important de fonctions cellulaires, telles que celles représentées en bleu ici. Le rôle central de la protéine GRB2, tout comme d'autre protéines effectrices, est parfois comparé à l'entonnoir d'un sablier, régulant le flux d'informations entre un étage supérieur et inférieur. La robustesse de ce type de systèmes se base sur la redondance des interactions et la modularité des protéines de ces réseaux.

Dans cette représentation, les signaux entrants, perçus notamment par les RTK, représentent la partie haute du sablier. La grande diversité des signaux extracellulaires et de leurs récepteurs est traduite par la largeur de cette partie du sablier. La transduction du signal quant à elle, fait intervenir un nombre limité d'intervenants, telles que les protéines adaptatrices, qui vont permettre l'activation de différentes voies de signalisation dont le nombre demeure cependant limité, telles que la voie MAPK ou la voie PI3K/AKT par exemple. Ces acteurs de la signalisation correspondent au processus central des réseaux de signalisation, et donc à la partie resserrée du sablier, contrôlant le flux de sable ou d'informations transmises d'amont en aval. La détection de coïncidence assurée par les protéines adaptatrices permettrait ainsi d'intégrer les signaux provenant de différents acteurs en amont. Enfin, la grande diversité des réponses et changements phénotypiques que les cellules peuvent adopter en réponse aux signaux extérieurs (e.g. survie, apoptose, prolifération, différenciation, migration, adhésion) est représentée par la largeur de la partie inférieure du sablier (Citri and Yarden, 2006).

Selon ce modèle, les protéines adaptatrices appartiendraient au processus central, intégrant les différents signaux extracellulaires puis recrutant et activant certaines des voies de signalisation canoniques afin d'apporter un changement cellulaire phénotypique spécifique au signal ou à la combinaison de signaux extérieurs. En effet, la majorité des protéines adaptatrices peuvent interagir avec différents récepteurs, et permettent le recrutement d'un grand nombre d'effecteurs cytoplasmiques (Bisson et al., 2011). De plus, certains effecteurs peuvent être recrutés par différentes protéines adaptatrices. Par exemple, NCK1/2 et GRB2 peuvent interagir avec WASP (Weisswange et al., 2009). À l'inverse, une protéine adaptatrice peut recruter un même effecteur en aval de deux récepteurs différents, tel que GRB2 qui recrute SOS afin de permettre l'activation de la voie MAPK en aval de EGFR et FGFR2 (Buday and Downward, 1993; Cheng et al., 1998). Cependant, la spécificité de liaison de leur domaine d'interaction aux récepteurs (i.e. domaine SH2) et de leurs autres

sites de liaison à des effecteurs cytoplasmiques (i.e. SH3) présentent des caractéristiques propres à chaque protéine adaptatrice, régulant ainsi la compétition des interactions au sein des complexes signalétiques, ainsi que la cinétique de ces interactions. Les complexes signalétiques nucléés par les protéines adaptatrices ainsi que leur dynamique peuvent de ce fait présenter certaines caractéristiques spécifiques des signaux extracellulaires perçus et des réponses cellulaires engagées (Pawson et al., 2001). Ainsi, l'analyse des complexes nucléés par différentes protéines adaptatrices dans différents contextes cellulaires pourrait amener des informations importantes sur l'organisation des réseaux de signalisation, notamment sur le lien entre les complexes communs du processus central et la spécificité des réponses cellulaires engagées.

Une étude du laboratoire a effectivement mis en évidence que les réseaux de signalisation nucléés par GRB2 sont spécifiques à la stimulation des cellules par différents facteurs de croissance (Bisson et al., 2011). Cette étude a également montré que les complexes d'interaction de GRB2 après stimulation à l'EGF sont très finement régulés dans le temps, permettant ainsi de différencier plusieurs types d'interaction de GRB2 avec ses partenaires. Ce point est particulièrement intéressant pour l'amélioration de notre compréhension des réseaux de signalisation, et de la prise de décision cellulaire de la réponse apportée à une combinaison de signaux donnée. En effet, des études ont proposé que ce déterminisme soit apporté par la durée d'activation des voies de signalisation intracellulaire plus que par leur nature, soulignant l'importance de la caractérisation de la dynamique des réseaux de signalisation (Ebisuya et al., 2005; Ideker and Krogan, 2012). L'état des réseaux de signalisation, et des réseaux d'interactions de GRB2 en particulier, ainsi que la dynamique de ces derniers procurent ainsi des informations précieuses pour améliorer notre compréhension de la communication cellulaire, de sa régulation, et ainsi des pathologies telles que le cancer découlant d'anomalies de la signalisation cellulaire.

1.1.3.2. Des approches protéomiques permettent d'analyser la dynamique des réseaux de signalisation cellulaire

L'identification des interactions protéine-protéine apporte de ce fait des informations précieuses sur la régulation et la fonction des différents acteurs des réseaux de signalisation. Classiquement étudiées par des techniques d'immuno-purifications ou purifications d'affinité (IP ou AP) suivies de Western blot et de double hybride par exemple, les interactions protéine-protéine et leur caractérisation ont grandement bénéficié des avancées technologiques en spectrométrie de masse (MS). Ces analyses permettent maintenant de séquencer à haut débit (jusqu'à plusieurs milliers de peptides par échantillons) et d'identifier des protéines présentes dans un échantillon, sans biais d'hypothèse initiale (Choudhary and Mann, 2010). Le couplage d'expériences d'IP ou AP avec des analyses de spectrométrie de masse (AP-MS) permet ainsi l'identification des protéines associées à la proie immunopurifiée, permettant de ce fait la description en profondeur des réseaux de signalisation cellulaire. Cependant, toutes ces analyses ne permettent pas d'apprécier la dynamique de ces réseaux, point fondamental de la signalisation cellulaire. En effet, la nature des interactions au sein des réseaux de signalisation ne résume pas totalement la spécificité des réponses cellulaires, et la dynamique de ces interactions apporte des informations supplémentaires relatives au lien entre les réseaux de signalisation et les phénotypes cellulaires dans un contexte donné (Bisson et al., 2011; Ebisuya et al., 2005).

Deux approches de protéomique quantitative très fiables peuvent être couplées à des expériences d'IP afin de décrire la dynamique des interactions étudiées. La SRM (*Single Reaction Monitoring*) est une méthode d'acquisition ciblée permettant la quantification de plusieurs centaines de peptides par expérience. Cette méthode est très reproductible et très sensible, mais nécessite l'identification préalable des protéines à quantifier, et demeure limitée dans le nombre de protéines analysables par expérience (Bisson et al., 2011; Picotti et al., 2009). Le SWATH, pour *Sequential Window Acquisition of all THeoretical spectra*, est une autre méthode de protéomique quantitative mise au point dans les dernières années, permettant simultanément l'identification et la quantification de protéines avec une reproductibilité et une sensibilité proches de celles de la SRM (Gillet et al., 2012). Leur utilisation pour l'analyse des partenaires de différentes protéines (AP-SRM ou AP-SWATH)

permet ainsi de décrire la dynamique des réseaux de signalisation (Bisson et al., 2011; Lambert et al., 2013). La cinétique de nucléation de complexes signalétiques par GRB2 après différentes stimulations a ainsi pu être analysée grâce à une approche d'AP-SRM, et les complexes de GRB2 modulés par le blocage d'EGFR ou FGFR ont été caractérisés par AP-SWATH (Bisson et al., 2011; Findlay et al., 2013; Lambert et al., 2013).

Les protéines adaptatrices, et GRB2 plus particulièrement, appartiennent donc au processus central de la transduction du signal, soulignant ainsi leurs rôles très variés dans la signalisation cellulaire.

1.1.4. Fonctions de GRB2 dans la signalisation cellulaire

Les protéines adaptatrices sont impliquées dans la transduction du signal, notamment en aval des RTK, et de ce fait participent au contrôle de nombreux processus extrêmement variés. En effet, ces protéines adaptatrices peuvent réguler le métabolisme des phospholipides membranaires (Aksamitiene et al., 2012; Wang et al., 1995), les cycles d'activation des petites GTPases (Buday and Downward, 1993; Gale et al., 1993; Li et al., 1993), l'expression génique (Buday and Downward, 1993; Gale et al., 1993; Li et al., 1993), la réorganisation du cytosquelette, la phosphorylation ou déphosphorylation (Lock et al., 2000) ou encore l'ubiquitylation et la stabilité de certaines protéines (Huang, 2005). Les protéines adaptatrices sont ainsi impliquées dans le contrôle de fonctions cellulaires très variées, telles que la prolifération, la différenciation, la survie, l'apoptose, ou encore la motilité cellulaires (Giubellino et al., 2008; Pawson, 2007). L'importance de ces protéines dans la signalisation est soulignée par le fait que la majorité d'entre elles, et tous les membres de la sous-famille des protéines adaptatrices à domaine SH2/SH3 sont impliqués dans le développement embryonnaire (Bladt et al., 2003; Cheng et al., 1998; Park et al., 2006).

L'expression de *GRB2* est ubiquitaire chez les mammifères, bien que les niveaux de messagers suggèrent des niveaux d'expression particulièrement élevés dans certains tissus, tels que le cerveau et la rate, soulignant le rôle potentiellement important de cette protéine adaptatrice (Lowenstein et al., 1992). Par ailleurs, quatre isoformes alternatifs de GRB2 ont été recensés dans la littérature, dont trois chez le rat (Watanabe et al., 1995) et un chez l'humain (Fath et al., 1994). Ces isoformes ont été détectés dans différents tissus, mais à des

niveaux plus restreints que GRB2 pleine longueur (Fath et al., 1994; Watanabe et al., 1995). De plus, ces deux études ont montré que trois de ces isoformes, présentent des interactions modifiées avec différents partenaires de GRB2 et inhibent la signalisation mitogénique induite par EGFR ou PDGFR lorsqu'injectés dans des cellules en culture (Fath et al., 1994; Watanabe et al., 1995). Ces études suggèrent ainsi un rôle de ces isoformes dans la régulation de la transduction du signal par GRB2, cependant aucune étude ne s'est intéressée par la suite à la pertinence biologique de ces isoformes. De plus, aucune preuve de leur expression protéique n'est disponible, suggérant que ces isoformes puissent correspondre à des artefacts de séquençage.

Le rôle d'adaptateur dans la transduction du signal de GRB2 est assuré par son interaction avec différentes combinaisons de partenaires via ses domaines SH2 et SH3, tels que des récepteurs et des effecteurs cytoplasmiques. Premièrement identifié comme interacteur d'EGFR et PDGFR (Lowenstein et al., 1992), GRB2 a par la suite été décrit comme partenaire direct ou indirect d'un nombre très important de RTK, tels que FGFR (Klint et al., 1995), VEGFR (Ito et al., 1998), IGFR (Xu et al., 1995), MET (Ponzetto et al., 1994), ou encore d'autres types de récepteurs tels que le récepteur de cytokines PRLR (Minoo et al., 2003) et le récepteur sérine/thréonine kinase au TGF β , T β R-II (Galliher-Beckley and Schiemann, 2008). L'association de récepteurs avec GRB2 est parfois directe, comme celle certaines tyrosines d'EGFR reconnues par le domaine SH2 de GRB2, celle de la Y1144 de HER2, ou encore l'interaction de GRB2 avec le T β R-II via la tyrosine Y284 de ce dernier (Dankort et al., 1997; Galliher and Schiemann, 2007; Schulze et al., 2005). Le recrutement de GRB2 aux RTK ou autres récepteurs peut également être indirect, via des protéines d'arrimage telles que IRS1/2 (Skolnik et al., 1993), FRS1/2 (Kouhara et al., 1997), ou GAB1 (Holgado-Madruga et al., 1996), via d'autres protéines adaptatrices telles que SHC1 (Skolnik et al., 1993), ou encore via des enzymes telles que PTPN11 (Minoo et al., 2003). Le recrutement de GRB2 aux RTK activés, direct ou indirect, est en règle générale régulé par des évènements de phosphorylation et dépend de ce fait du domaine SH2 de la protéine adaptatrice (Lowenstein et al., 1992). Cependant, il a été démontré que GRB2 peut interagir avec le RTK FGFR2 via son domaine cSH3, et cette interaction contribuerait à un rétrocontrôle négatif de la signalisation en aval (Ahmed et al., 2010).

1.1.4.1. GRB2 assure l'activation de plusieurs voies de signalisation en aval de nombreux récepteurs membranaires

Le premier rôle de GRB2 dans la signalisation décrit dans la littérature est le recrutement membranaire de SOS1 par l’interaction du complexe GRB2-SOS (lié préférentiellement via le domaine nSH3 de GRB2) avec un RTK activé s’associant au domaine SH2 de GRB2 (Buday and Downward, 1993; Gale et al., 1993; McDonald et al., 2008a; Rozakis-Adcock et al., 1993). La protéine SOS, lorsque recrutée à la membrane, peut interagir avec la petite GTPase RAS et favoriser l’échange GDP-GTP de cette dernière, participant ainsi à son activation. RAS activée est responsable de l’activation de la voie ERK/MAPK via l’activation successive de RAF, MEK et ERK (Gale et al., 1993). Il a par ailleurs été montré que le recrutement de GAB1 et/ou GAB2 à certains RTK activés via leur interaction avec le domaine cSH3 de GRB2 permet le recrutement de PTPN11 et de PI3K, nécessaires respectivement à l’activation soutenue de la voie RAS/MAPK et à l’amplification de la signalisation pro-survie et mitogénique (Araki et al., 2003; Cunnick et al., 2002). Ainsi l’activation soutenue de cette voie de signalisation requiert à la fois le recrutement de SOS1 et GAB1 à la membrane, tous deux dépendants de leur association à GRB2, en aval de certains RTK comme le PDGFR (Araki et al., 2003; Cunnick et al., 2002).

L’activation de ERK a été associée avec de nombreux processus cellulaires, tels que la survie, la prolifération, le métabolisme, la migration ou encore la sénescence (Ebisuya et al., 2005). De par son rôle central dans l’activation de ERK, GRB2 est également essentielle à ces fonctions (Buday and Downward, 1993; Cheng et al., 1998, 2014; Stern et al., 1993). La petite protéine adaptatrice GRB2 peut également participer à l’activation de la PI3K en aval de certains RTK tels que IGFR et EGFR (Takahashi et al., 1999). Le recrutement membranaire de la PI3K peut être dirigé par des RTK activés, par l’interaction de sa sous-unité régulatrice PI3KR1 avec GRB2, ou encore par l’interaction de protéines effectrices telles que GAB1, elles-mêmes associées aux RTK ou à GRB2 (Holgado-Madruga et al., 1996; Schulze et al., 2005; Takahashi et al., 1999; Wang et al., 1995). Le recrutement membranaire du complexe PI3K conduit à son activation et lui permet d’assurer ses fonctions de phosphorylation des PIP2, créant ainsi des régions membranaires riches en PIP3 au voisinage des RTK activés. Ces régions participent à leur tour, de façon autonome ou de

concert avec les RTK activés, au recrutement d'effecteurs cytoplasmiques telles la protéine AKT arborant des domaines d'association aux PIP3 comme le domaine PH. L'activation de la PI3K et d'AKT dépendante de GRB2 participe à de nombreux processus tels que la survie, la croissance ou encore la régulation du métabolisme cellulaire (Aksamitiene et al., 2012).

1.1.4.2. La protéine adaptatrice GRB2 régule la dynamique du cytosquelette et l'adhésion cellulaire

En sus de la régulation des voies mitogéniques ERK et PI3K/AKT, la protéine adaptatrice GRB2 est essentielle à la nucléation de plusieurs complexes signalétiques impliqués dans la régulation de la dynamique du cytosquelette. GRB2 est notamment requise à la stabilisation de l'association de WASP et d'ARP2/3 aux extrémités barbues des filaments d'actine, et participe ainsi au contrôle de la vitesse de polymérisation de l'actine (Weisswange et al., 2009). Il a également été démontré que GRB2 interagit avec la protéine PAK1 après stimulation à l'EGF, permettant ainsi le recrutement de cette dernière à EGFR activé. De plus, cette étude a décrit le rôle de cette interaction dans la formation de lamellipodes. En effet, l'activation d'EGFR suite à une stimulation à l'EGF conduit à la formation de lamellipodes et à l'expansion de la membrane plasmique. L'inhibition de l'interaction entre GRB2 et PAK1 entrave le recrutement de la kinase effectrice au RTK activé et ainsi la formation des lamellipodes et l'expansion de la membrane plasmique induites par l'EGF (Puto, 2003).

La protéine adaptatrice GRB2 participe de plus au couplage de la signalisation en aval des RTK et des récepteurs d'adhésion tels que les intégrines (Schlaepfer et al., 1994). GRB2 est notamment requise pour la nucléation et l'activation du complexe SRC-FAK en aval d'intégrines stimulées par la fibronectine, en favorisant la phosphorylation de la tyrosine Y397 de FAK nécessaire à son interaction avec SRC (Cheng et al., 2014). GRB2 est de surcroit impliquée dans le couplage de ce complexe SRC-FAK à la phosphatase membranaire PTPRA, activée elle aussi par les intégrines (Cheng et al., 2014). L'association de ces trois enzymes, sous la dépendance de leur interaction avec GRB2, est essentielle à l'étalement ainsi qu'à la migration cellulaires sur fibronectine. La protéine adaptatrice GRB2 constitue

ainsi un régulateur central de la signalisation initiée aux points focaux d’adhésion (Cheng et al., 2014).

Il a de plus été démontré que GRB2 est cruciale à l’activation de RAS en aval des intégrines activées (Crampton et al., 2009; Schlaepfer et al., 1994, 1997), et qu’elle est également essentielle à l’intégration des signaux provenant des intégrines et de la voie WNT (Crampton et al., 2009).

Ces exemples soulignent le rôle de GRB2 dans le dialogue entre les différentes voies de signalisation cellulaires, notamment dans la modulation de voies signalétiques comme les RTK ou la voie WNT en fonction de l’adhésion et du microenvironnement cellulaire. Ces mécanismes de régulation de la signalisation cellulaire par les interactions cellules-microenvironnement, via la protéine adaptatrice GRB2 notamment, sont primordiaux à l’homéostasie tissulaire, et sont fréquemment dérégulés dans le cancer (Giubellino et al., 2008).

1.1.4.3. GRB2 participe à la régulation négative de la transduction du signal

La protéine adaptatrice GRB2 joue également un rôle dans le contrôle négatif de la signalisation en aval des RTK. En effet, GRB2 est impliquée dans l’endocytose de certains RTK, tels qu’EGFR (Sorkin and Goh, 2009; Wang and Moran, 1996), HER3 (Sorkin and Goh, 2009), HER4 (Sorkin and Goh, 2009), PDGFR (Wang et al., 2004b), MET (Li et al., 2007), KIT (Sun et al., 2007) ou encore RON (Penengo et al., 2003). Elle est de même impliquée dans l’endocytose de protéines membranaires autres que les RTK, telles la protéase ADAM12, la glycoprotéine membranaire MUC1 ou bien des récepteurs couplés aux protéines G (Kinlough et al., 2004; Luttrell et al., 1997; Stautz et al., 2012).

Les premières évidences du rôle de GRB2 dans ces processus proviennent de la localisation de cette dernière avec certains RTK comme l’EGFR dans les endosomes, ainsi qu’avec des protéines d’assemblage du manteau de clathrine à la membrane plasmique (Jiang, 2003; Scaife et al., 1994). L’étude de Wang et Moran en 1996 a démontré la nécessité de l’interaction de GRB2 avec EGFR pour l’internalisation de ce dernier, par microinjections de domaine SH2 ou d’un phosphopeptide inhibant compétitivement l’interaction de ces deux

partenaires (Wang and Moran, 1996). Il a tout d'abord été suggéré que ces fonctions soient dépendantes de l'interaction de GRB2 avec la GTPase DNM2 (Scaife et al., 1994; Wang and Moran, 1996), une protéine associée aux microtubules impliquée dans l'endocytose (Scaife et al., 1994; Wang and Moran, 1996). Cependant, le rôle du complexe GRB2-DNM2 dans ces processus reste débattu (Huang, 2005). En revanche, l'interaction de GRB2 avec l'ubiquitine ligase E3 CBLB a été démontrée comme essentielle et suffisante à l'internalisation d'EGFR activé par certains de ses ligands tels qu'EGF et TGF α (Fortian and Sorkin, 2014; Huang, 2005). Le recrutement de CBL aux récepteurs via GRB2 est également requis pour l'internalisation de KIT et MET (Li et al., 2007; Sun et al., 2007). Il a de plus été montré que GRB2 est responsable du recrutement de USP6NL, une GAP régulant négativement la protéine endosomale RAB5 après stimulation à l'EGF (Martinu et al., 2002). Ce recrutement participe ainsi au contrôle négatif, dépendant de GRB2, de l'internalisation de certains RTK (Martinu et al., 2002).

Le rôle de GRB2 dans l'endocytose de ces récepteurs peut ainsi participer au contrôle négatif de la signalisation dépendante des RTK, lorsque l'internalisation du récepteur conduit au détachement du ligand ou bien à la dégradation du récepteur. Par exemple, l'internalisation d'EGFR dépendante de CBL et de GRB2 peut s'accompagner d'une diminution de l'activation de la voie RAS/MAPK (Pinilla-Macua et al., 2016). Il est cependant suggéré que l'association de ces RTK avec GRB2 à la membrane des endosomes permette à ces derniers de maintenir l'activation de la signalisation en aval (Fortian and Sorkin, 2014).

Outre son rôle dans l'internalisation de certains récepteurs membranaires, GRB2 permet l'assemblage d'autres complexes impliqués dans le rétrocontrôle négatif de la signalisation en aval de RTK. Par exemple, les protéines SPRY 1/2, impliquées chez la drosophile dans l'inhibition de la signalisation en aval de FGFR et d'EGFR, exercent ces fonctions en interagissant avec GRB2, en aval de FGFR2 activé notamment (Hanafusa et al., 2002). Chez l'humain, il a été montré que la liaison de l'orthologue SPRY2 à GRB2 est dépendante de sa phosphorylation, et compétitionne avec l'association de cette protéine adaptatrice à FRS2 et PTPN11, inhibant ainsi l'activation de la voie RAS/MAPK (Hanafusa et al., 2002).

Par ailleurs, il a été montré que l'activation d'EGFR et BCR/ABL conduit à la phosphorylation de GRB2 sur sa tyrosine 209 (Li et al., 2001). Cette phosphorylation inhibe son association à SOS et de ce fait l'activation de la voie MAPK, constituant ainsi un

mécanisme précoce de contrôle négatif de la transduction du signal (Li et al., 2001). Il a été suggéré que ce mécanisme de contrôle négatif par phosphorylation du domaine cSH3 de GRB2 permette de réguler la transduction du signal lorsque GRB2 est recrutée aux RTK activés de façon directe, et que le recrutement indirect de cette protéine adaptatrice aux RTK, qui ne permet pas la phosphorylation de sa tyrosine 209, soit un mécanisme favorisant une activation soutenue des voies de signalisation en aval (Li et al., 2001).

Enfin, il a été décrit que GRB2 homodimérisé en solution ainsi que dans des modèles cellulaires, et il est ainsi proposé dans la littérature que l'équilibre monomère-dimère de cette protéine adaptatrice régule ses capacités à nucléer des complexes signalétiques et de ce fait la transduction du signal en aval des RTK activés. Par exemple, il a été montré *in vitro* que le domaine SH2 de GRB2 en solution homodimérisé dans un équilibre favorisant la forme dimérique (Schiering et al., 2000). Il a par ailleurs été décrit que la dissociation du dimère peut être induite par la liaison d'un des domaines SH2 du dimère à une cible, ou par phosphorylation de GRB2 sur sa tyrosine Y160 (Ahmed et al., 2015). De nombreuses études biochimiques et biophysiques se sont intéressées à l'effet de la dimérisation de GRB2 sur ses interactions. Il a par exemple été démontré que la forme dimérique de GRB2 présente une affinité pour un phosphopeptide de SHC1 fortement réduite comparativement à sa forme monomérique (Benfield et al., 2007). Toujours *in vitro*, il a été montré que SOS1 et GAB1 interagissent avec GRB2 dans un ratio 1:2 (McDonald et al., 2013), faisant intervenir des surfaces de domaines nSH3 (SOS1) et cSH3 (GAB1) des deux molécules de GRB2 au sein du dimère (McDonald et al., 2012, 2013). Ces études ont également permis de mettre en évidence une allosterie mutuellement exclusive dans la liaison de ces deux partenaires à GRB2, la liaison de SOS1 aux domaines nSH3 du dimère de GRB2 empêchant la liaison de GAB1 aux domaines cSH3 et vice versa (McDonald et al., 2013).

D'un point de vue fonctionnel, différentes études ont souligné l'implication de la dimérisation de GRB2 dans la régulation de la signalisation cellulaire. Par exemple, des travaux portant sur le rôle de PTPRA dans la migration cellulaire ont démontré que GRB2 est requise pour coupler PTPRA au complexe SRC-FAK (Cheng et al., 2014). Les auteurs ont pu démontrer que l'interaction du domaine de GRB2 à deux tyrosines phosphorylées via son domaine SH2, l'une sur PTPRA et l'autre sur FAK, est à l'origine de l'association de PTPRA et SRC-FAK. Les auteurs ont ainsi proposé qu'un dimère de GRB2, pouvant ainsi

accorder deux tyrosines phosphorylées simultanément, soit responsable de la nucléation de ce complexe signalétique (Cheng et al., 2014). D'autres études ont mis en évidence un rôle inhibiteur du dimère de GRB2 en aval de FGFR2 (Ahmed et al., 2013, 2015; Lin et al., 2012). Cette équipe a en effet démontré qu'en absence de stimulation, un dimère de GRB2 interagit avec deux molécules de FGFR2, via l'association des domaines cSH3 avec des séquences riches en proline de la queue C-terminale de FGFR2 (Lin et al., 2012). L'hétérotétramère ainsi formé est responsable d'un niveau de phosphorylation basal de FGFR2, traduisant l'activation catalytique de ces RTK, mais serait maintenu dans un état non signalétique par l'encombrement stérique du dimère de GRB2 inhibant le recrutement de protéines effectrices. L'activation de FGFR2 par la liaison à son ligand permettrait la phosphorylation de GRB2 sur sa tyrosine Y209, inhibant l'interaction de GRB2 dimérique au dimère de FGFR2 (Lin et al., 2012), ainsi que la phosphorylation de la tyrosine Y160 de GRB2, entraînant la dissociation du dimère de GRB2 (Ahmed et al., 2015). GRB2 présenterait donc ici un rôle de contrôle négatif de la signalisation en aval de FGFR2 tout en favorisant la formation de dimères de récepteurs à la membrane pour leur activation rapide suite à une stimulation (Ahmed et al., 2013, 2015; Lin et al., 2012).

Bien que l'existence de la forme dimérique de GRB2 soit très bien caractérisée *in vitro*, la pertinence des formes dimériques et monomériques dans le cadre de la signalisation cellulaire restent débattues, notamment en raison de l'absence d'outils permettant de différencier avec certitude les deux formes dans des modèles cellulaires (Ahmed et al., 2015; Benfield et al., 2007; McDonald et al., 2008b, 2012, 2013; Schiering et al., 2000). Par exemple, en surexprimant à différentes concentrations GRB2 sauvage, induisant selon l'hypothèse de cette étude une augmentation de la proportion de la forme dimérique, l'équipe du Dr Ladbury a démontré que l'activation de la voie RAS/MAPK en aval de FGFR2 serait inhibée par la forme dimérique de GRB2 (Lin et al., 2012). Cependant, aucun contrôle ne permet de vérifier que la surexpression de GRB2 sauvage conduit effectivement à une augmentation de GRB2 dimérique plutôt qu'à un agrégat protéique, ni que cette dimérisation soit ainsi bien la cause de l'inhibition de la voie RAS/MAPK. D'autre part, il a été montré par quantification des partenaires de GRB2 dans un modèle de cellules humaines exprimant à différents niveaux une version exogène de GRB2 (sub-endogènes ou surexpression importante) que les interactions de cette protéine adaptatrice ne sont pas affectées

qualitativement ni quantitativement par sa surexpression (Bisson et al., 2011, données non publiées). Enfin, le mécanisme de régulation négative de la signalisation par la forme dimérique de GRB2 décrite par l'équipe du Dr Ladbury en aval de FGFR2 n'est actuellement pas démontré pour aucun autre RTK, et pourrait aussi bien être un niveau de contrôle de la signalisation très généralisé qu'un phénomène anecdotique. Malgré des évidences suggérant fortement l'implication de la dimérisation de GRB2 dans la régulation de la signalisation, des travaux plus précis seraient nécessaires pour affiner la compréhension de ces mécanismes.

La protéine adaptatrice GRB2 constitue ainsi un lien primordial entre récepteurs et protéines effectrices dans la transduction du signal, mais également dans sa régulation fine. Ce rôle majeur de GRB2 est souligné par l'implication de cette protéine adaptatrice dans le développement embryonnaire.

1.1.5. GRB2 joue un rôle clé dans le développement embryonnaire

Étant donné le rôle central de la protéine adaptatrice GRB2 dans la transduction du signal en aval de nombreux récepteurs et dans l'activation d'autant de voies signalétiques pléiotropiques, il n'est pas surprenant que cette dernière soit essentielle au développement précoce d'organismes multicellulaires (Lim and Pawson, 2010).

L'orthologue de GRB2 chez le nématode, SEM-5, a été caractérisé grâce à des criblages s'intéressant au développement embryonnaire (Clark et al., 1992). Des mutations dans le gène *sem-5* ont en effet été identifiées pour leur phénotype de létalité aux stades précoces du développement larvaire, ou de défauts de développement de la vulve et de migration des myoblastes sexuels, d'où son nom *SEX Muscle abnormal 5* ou *sem-5* (Clark et al., 1992). Le phénotype d'absence de vulve est également observé pour des mutations dans *let-23* et *let-60*, correspondant aux orthologues d'EGFR et RAS respectivement, ce qui a permis d'identifier le premier rôle de GRB2 dans la transduction du signal en aval des RTK (Clark et al., 1992; Lowenstein et al., 1992). Certaines des mutations de *sem-5* identifiées dans ces cibles correspondent à des résidus conservés des domaines SH2 et SH3 nécessaires à la reconnaissance de leur motif de liaison. Ces travaux ont de ce fait souligné l'importance des interactions de GRB2 dans la signalisation cellulaire, ainsi que la nécessité des trois domaines fonctionnels, non redondants, de GRB2 (Clark et al., 1992). La restauration du

développement vulvaire dans les animaux mutants *sem-5* par les orthologues de la drosophile et humain (DRK et GRB2) ainsi que par des mutants de RAS suractivés ont permis de mettre en évidence d'une part la conservation fonctionnelle de GRB2 dans l'évolution, et d'autre part son rôle de régulation de la transduction du signal entre EGFR et RAS (Beitel et al., 1990; Han and Sternberg, 1990; Stern et al., 1993). À l'inverse, le rôle de SEM-5 dans la migration des myoblastes sexuels semble indépendant de LET-23 et LET-60, mais dépendant de l'orthologue du RTK FGFR chez le nématode, codé par le gène *degl-15* (Clark et al., 1992).

L'orthologue de GRB2 chez la drosophile, DRK (*Downstream of Receptor Kinases*), a été identifié au début des années 1990 dans un crible génétique visant à caractériser des produits de gènes impliqués dans la signalisation par le RTK *Sevenless* (SEV) dans la différenciation du photorécepteur R7 (Simon et al., 1991, 1993). La liaison de SEV à son ligand *Bride Of Sevenless* ou BOSS à la surface du huitième photorécepteur (R8) est requise pour l'induction de la différenciation de R7 (Basier and Hafen, 1988). Les études portant sur le rôle de DRK et l'orthologue de RAS, RAS1, toutes les deux requises en aval de SEV pour cette différenciation, ont montré que ces deux dernières sont également nécessaires à la différenciation des autres photorécepteurs chez la drosophile, suggérant que ces protéines sont impliquées dans la signalisation en aval de SEV mais également d'autres récepteurs exprimés par les photorécepteurs autres que R7 (Simon et al., 1993). D'autre part, ces travaux ont montré que RAS1 constitutivement active permet de restaurer la différenciation des photorécepteurs en absence de DRK, soulignant ainsi la possibilité que ces deux protéines agissent dans la même voie de signalisation, et que DRK permette l'activation de RAS1 en aval de SEV et d'autres RTK (Simon et al., 1993). Enfin ces travaux, ainsi que d'autres, ont montré pour la première fois que DRK interagissait *in vitro* avec SEV et SOS (Olivier et al., 1993; Simon et al., 1993). Par la suite, de nombreuses études ont impliqué DRK dans différents processus développementaux chez la drosophile, tels que l'apprentissage et la mémoire olfactive ou encore la différenciation des spermatides (Bergeret et al., 2001; Moressis et al., 2009).

Chez la souris, la délétion homozygote de *Grb2* est létale au stade E3.5 (Cheng et al., 1998), suite à l'absence de différenciation de l'endoderme primitif (Chazaud et al., 2006; Cheng et al., 1998). Ces travaux ont également démontré que le recrutement de SOS1 à la

membrane par GRB2 et l'activation subséquente de RAS sont requis pour cette différenciation. En effet, l'expression d'une version constitutivement active de RAS ou de la protéine SOS1 fusionnée au domaine SH2 de GRB2, permettant le recrutement membranaire de cette chimère, restaurent toutes deux la différenciation des blastocystes *Grb2*^{-/-} *in vitro* (Cheng et al., 1998). Enfin, en injectant des cellules ES *Grb2*^{-/-} dans des morula sauvages, les auteurs ont également pu mettre en évidence la nécessité de GRB2 et de son interaction avec SOS1 pour la différenciation de l'épiblaste (Cheng et al., 1998). Cette étude a ainsi été la première à mettre en évidence un rôle dans le développement mammifère des adaptateurs à domaine SH2/SH3 tels que GRB2 (Cheng et al., 1998).

Il a par la suite été montré que GRB2 est requise pour la ségrégation dans la masse cellulaire interne des cellules précurseurs de l'épiblaste et de l'endoderme primitif au stade E3.5 (Chazaud et al., 2006). En effet, chez les embryons sauvages, l'expression en ségrégation de certains facteurs de transcription clés permet de déterminer le destin des cellules avant leur différenciation, tandis que les embryons *Grb2*^{-/-} ne présentent aucune ségrégation cellulaire à E3.5, empêchant de ce fait la différenciation de l'endoderme primitif (Chazaud et al., 2006).

Des travaux récents ont décrit plus en détail les mécanismes moléculaires impliquant GRB2 dans la différenciation endodermique (Findlay et al., 2013). En effet, il a été montré que l'expression ectopique de la chimère de SOS1 fusionnée au domaine SH2 de GRB2 restaure le recrutement de SOS1 au récepteur FGFR2 activé par FGF4. Ceci permet de restaurer l'activation de ERK et la différenciation de l'endoderme primitif, soulignant ainsi le rôle de nucléateur de complexes signalétiques de GRB2 (Findlay et al., 2013). Dans ce contexte, l'adaptateur GRB2 amène un niveau de contrôle supplémentaire, et la coopération des domaines d'interaction protéine-protéine et protéine-lipide de GRB2 et SOS1 participe à la détection de coïncidence de différents signaux, et permet ainsi un contrôle spatio-temporel très strict de l'activation de la voie RAS/ERK menant à la différenciation des cellules souches lors de la formation de l'endoderme primitif (Findlay et al., 2013).

L'expression d'un allèle hypomorphique de *Grb2* (E89K) réduisant sa liaison via son domaine SH2 dans des modèles murins homozygotes, hétérozygotes ou *Grb2*^{E89K/-} a permis de mettre en évidence différents rôles développementaux de GRB2 après la différenciation de l'endoderme primitif et de l'épiblaste (Saxton et al., 2001). Ces études suggèrent en effet

un rôle de GRB2 dans la formation du placenta, dans la maintenance de l'intégrité du système cardio-vasculaire ainsi que dans la migration des cellules de la crête neurale conduisant à des défauts de formation des arc branchiaux (Saxton et al., 2001). Il a été suggéré que ces différents phénotypes soient causés par l'inhibition de la transduction du signal dépendante des phosphorylations sur tyrosine, assurée par l'interaction de GRB2 à ses effecteurs SOS1 et GAB1 (Saxton et al., 2001). Par ailleurs, une étude portant sur le rôle de GRB2 en aval de MET dans le développement murin a identifié un rôle de cette protéine adaptatrice dans le développement musculaire (Maina et al., 1996).

Ces études ont ainsi permis de mettre en évidence le rôle de GRB2 dans la transduction du signal en aval de différents RTK, et de son implication fonctionnelle dans le développement précoce ainsi que dans des processus développementaux plus tardifs, soulignant ainsi l'importance du rôle d'adaptateur de GRB2 dans la communication intercellulaire chez les organismes multicellulaires.

La protéine adaptatrice GRB2 est ainsi nécessaire à l'homéostasie cellulaire. Elle est notamment primordiale à la transduction du signal en aval du récepteur HER2 et à la transformation cellulaire induite par cet oncogène (Dankort et al., 1997; Slamon et al., 1987).

1.2. HER2 est un RTK au fonctionnement atypique

Les facteurs de croissance, décrits initialement comme des molécules sécrétées par certains tissus, stimulant des effets biologiques tels que la croissance et la prolifération cellulaire *in vitro* et *in vivo* ont suscité beaucoup d'intérêt au cours des années 50 et 60 (Cohen, 1962; Levi-Montalcini, 1952). Les récepteurs des facteurs de croissance ont quant à eux été caractérisés dans les années 70, cependant l'activité kinase de ces derniers n'a pas été relevée avant la découverte de l'activité catalytique de phosphorylation de la kinase SRC quelques années plus tard (Carpenter et al., 1978; Collett and Erikson, 1978; De Meyts et al., 1973; Schlessinger, 2014). L'importance de ces récepteurs et des voies de signalisation qu'ils contrôlent est soulignée par le nombre très important de pathologies dans lesquels des mutations de ces récepteurs ou autres dérégulations de leur activité ont été mis en cause, telles que le cancer, pour EGFR et HER2 par exemple ou le diabète pour IGFR (Lemmon and Schlessinger, 2010). Ces découvertes ont révolutionné nos connaissances biologiques de

ces pathologies, mais également leur prise en charge pharmacologique (Carpenter et al., 1978; Cohen, 1962; De Meyts et al., 1973; Mustoe et al., 1987; Schlessinger, 2014). Par exemple, la découverte de l’implication de différents RTK dans l’oncogenèse induite par différents rétrovirus, ainsi que la description de la dépendance réduite aux facteurs de croissance de cellules cancéreuses ont conduit au développement d’inhibiteurs ciblés de ces récepteurs, constituant ainsi les premiers agents thérapeutiques ciblés anti-tumoraux (Gschwind et al., 2004; Kawamoto et al., 1983; Temin, 1966, 1967, Yamamoto et al., 1983a, 1983b).

Le récepteur HER2 (*Human Epidermal Receptor 2*), également appelé NEU ou ErbB2 (*Erythoblastoma protein B*), est un RTK appartenant à la famille des récepteurs aux facteurs de croissance épidermiques HER. Caractérisé au début des années 80, l’implication de HER2 dans le cancer du sein a très rapidement été établie. L’identification de ce RTK, de son mode d’activation et de son rôle oncogénique dans la glande mammaire ont permis de développer l’une des premières thérapies ciblées anti-cancéreuses, et constitue l’un des exemples brillants de la nécessité de la recherche fondamentale en cancérologie.

1.2.1. Modes d’activation des RTK

1.2.1.1. Régulation de l’activité kinases des RTK

Il existe chez l’humain 58 RTK connus, regroupés en 20 sous-familles selon leur structure (Lemmon and Schlessinger, 2010). Tous les RTK présentent une architecture commune avec un domaine extracellulaire permettant la reconnaissance de leurs ligands respectifs, une hélice α transmembranaire, et une région intracellulaire comprenant une région régulatrice juxtamembranaire, un domaine tyrosine kinase et dans certains cas une queue C-terminale (Lemmon and Schlessinger, 2010).

De manière générale, la liaison d’un RTK à son ligand induit la dimérisation ou l’oligomérisation des récepteurs. Le dimère (ou oligomère) ainsi formé permet l’activation du domaine tyrosine kinase intracellulaire par des mécanismes propres à chaque récepteur (Lemmon and Schlessinger, 2010). En effet, quatre types de mécanismes de régulation de

l'activité kinase des RTK ont été décrits à ce jour (figure 1.8) (Lemmon and Schlessinger, 2010).

Les domaines kinases des RTK sont constitués de deux lobes (N et C) et d'une boucle d'activation, et sont précédés d'une région juxtamembranaire, et suivis d'une queue C-terminale (Huse and Kuriyan, 2002; Lemmon and Schlessinger, 2010). Ces domaines sont maintenus inactifs par différentes combinaisons d'interactions établies en *cis* avec le domaine tyrosine kinase par la boucle d'activation, la région juxtamembranaire et/ou la queue C-terminale (Lemmon and Schlessinger, 2010; Nolen et al., 2004). Un des mécanismes de régulation de l'activité catalytique du domaine tyrosine kinase des RTK fait intervenir des interactions entre la boucle d'activation et le site actif de la kinase, bloquant ainsi l'accès au substrat protéique ainsi qu'à l'ATP dans certains cas.

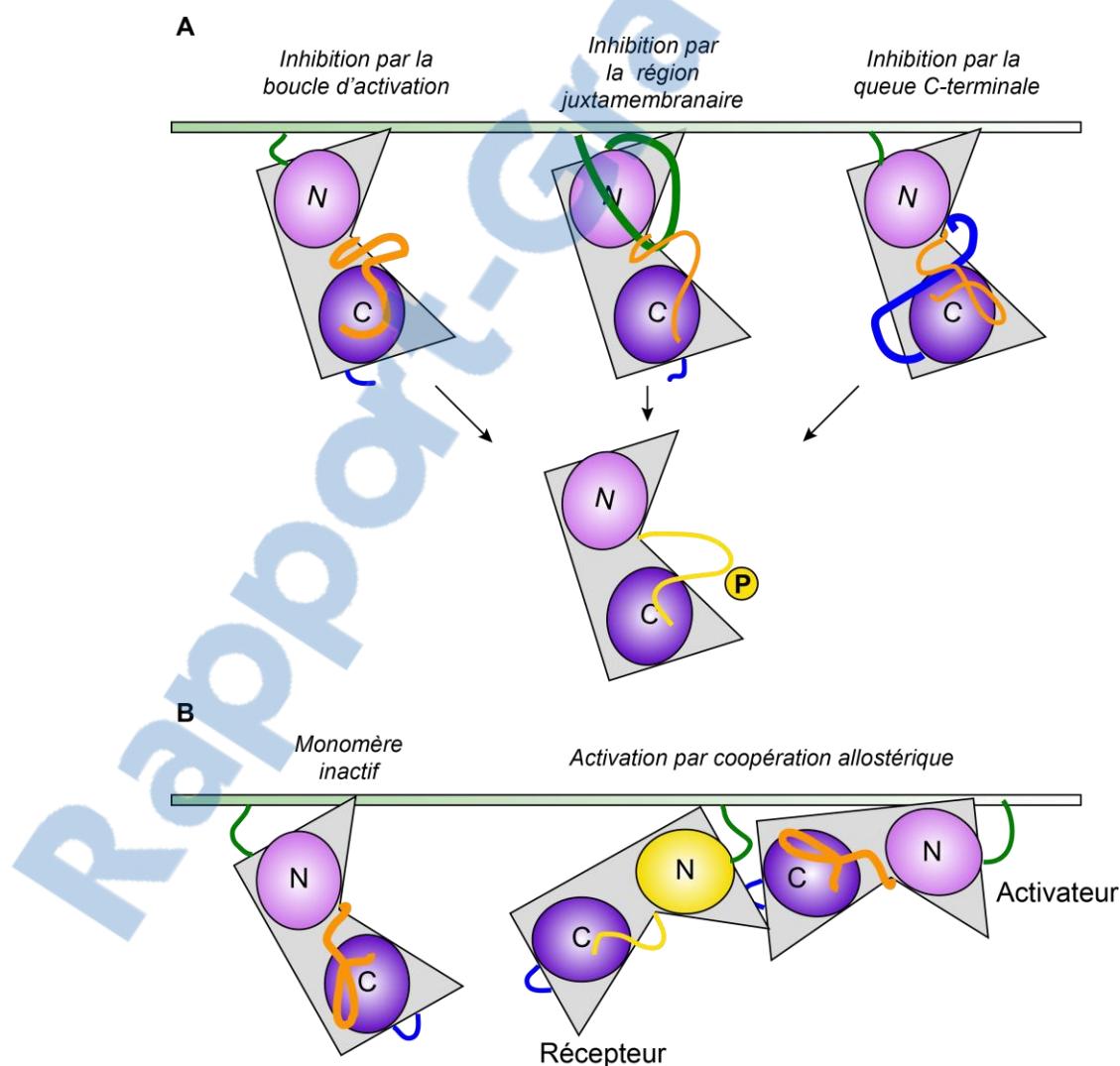


Figure 1.8 : L'activité du domaine kinase des RTK est régulée par la dimérisation.

En absence de stimulation, l'activité catalytique des RTK est inhibée par des interactions intra-moléculaires inhibant le domaine catalytique. Ces interactions inhibitrices peuvent faire intervenir la boucle d'activation (en orange lorsque le domaine est inactif, et en jaune sur les domaines activés), la région juxtamembranaire (en vert), ou la queue C-terminale (en bleu). A- La dimérisation induite par la liaison des RTK à leurs ligands permet la phosphorylation en *trans* de résidus tyrosines clés sur la boucle d'activation, perturbant les interactions inhibitrices et stabilisant une conformation active du domaine catalytique. B- Les récepteurs de la famille HER sont activés par allostérie. Après la dimérisation des récepteurs, induite par leur liaison à leurs ligands, les domaines cytoplasmiques des récepteurs de la famille HER subissent des changements de conformation. Ces derniers permettent au lobe C du domaine kinase dit activateur d'établir un contact direct avec le lobe N du domaine de l'autre récepteur dans le dimère, déstabilisant ainsi les boucles d'auto-inhibition limitant l'activité du domaine kinase récepteur.

(Inspirée de Lemmon and Schlessinger, *Cell*, 2010)

La phosphorylation de résidus tyrosines clés, par exemple par l'autre molécule de récepteur du dimère en *trans*, permet de déstabiliser ces interactions inhibitrices, et ainsi l'activation du domaine catalytique. Il a été démontré que les récepteurs IR (Huse and Kuriyan, 2002; Nolen et al., 2004) et FGFR (Mohammadi et al., 1996) sont régulés par ce mécanisme. Un deuxième mécanisme de régulation de l'activité kinase des RTK se base sur des interactions entre la région juxtamembranaire et le site actif du domaine kinase, stabilisant une conformation inactive de ce dernier. La phosphorylation de résidus tyrosines clés dans la région membranaire de ce type de récepteurs, tels que KIT (Mol et al., 2004), PDGFR (Dibb et al., 2004) ou les récepteurs EPH (Wybenga-Groot et al., 2001), déstabilise ces interactions inhibitrices et permet au domaine kinase d'adopter une conformation active. Des interactions inhibitrices entre la queue C-terminale de certains récepteurs, tels que TIE2, et leur site actif ont également été observées, et constituent le troisième type de mécanisme de régulation de l'activité kinase des RTK (Shewchuk et al., 2000). Enfin, certains RTK, tels que les membres de la famille HER voient leur activité catalytique régulée par allostérie. Par exemple, EGFR présente des interactions inhibitrices impliquant sa boucle d'activation. Lors de la dimérisation de ce récepteur, le domaine tyrosine kinase de l'une des molécules de récepteur, dit activateur, déstabilise les interactions inhibitrices du domaine tyrosine kinase de la seconde molécule de récepteur du dimère, dite réceptrice (Jura et al., 2009; Red Brewer et al., 2009; Zhang et al., 2006). La liaison du ligand et l'activation du domaine kinase des récepteurs HER conduit ainsi à la formation d'un dimère assymétrique (Jura et al., 2009; Red Brewer et al., 2009; Zhang et al., 2006). L'activation catalytique du récepteur activateur n'est

pas discutée dans ces travaux, laissant place à la possibilité que les deux récepteurs du dimère ne puissent être actifs simultanément. Cependant, une étude s'intéressant à l'hétérodimère EGFR/HER2 a par la suite proposé un modèle soutenant une activation simultanée des deux récepteurs (Macdonald-Obermann et al., 2012). Ce modèle stipule que la liaison d'EGFR à son ligand EGF induise la formation d'un hétérodimère où HER2 assume le rôle d'activateur, conduisant l'activation du domaine kinase d'EGFR (Macdonald-Obermann et al., 2012). Ce dernier serait alors responsable de la phosphorylation de HER2 et de son activation catalytique (Macdonald-Obermann et al., 2012). Ce point est crucial à la compréhension de la régulation de la signalisation induite par les récepteurs HER, notamment dans le contexte d'hétérodimères de récepteurs.

Ces mécanismes de régulation de l'activité kinase des RTK permet ainsi à la dimérisation des récepteurs d'induire la relaxation des inhibitions en *cis* via des autophosphorylations spécifiques en *trans*, comme pour FGFR (Mohammadi et al., 1996) ou la famille des EPH (Wybenga-Groot et al., 2001), ou bien par allostérie comme pour les récepteurs de la famille HER (Zhang et al., 2006) ou RET (Knowles et al., 2006).

L'activation du domaine kinase entraîne une première vague d'autophosphorylation en *trans* permettant de stabiliser la conformation active du domaine catalytique et d'augmenter son activité kinase (Lemmon and Schlessinger, 2010). Une seconde vague d'autophosphorylation s'ensuit (Lemmon and Schlessinger, 2010), créant de nouveaux sites de phosphorylation sur tyrosine (pY), permettant alors le recrutement de protéines cytoplasmiques contenant des domaines de reconnaissance des résidus pY tels que les domaines SH2 et PTB (Pawson, 2004). Ainsi, l'activation des RTK induit l'assemblage de complexes signalétiques assurant la transduction du signal en aval (Pawson, 2004; Schlessinger and Lemmon, 2003). Pour certains récepteurs tels que FGFR1, ces évènements sont suivis d'une troisième vague de *trans*-autophosphorylation permettant d'augmenter de nouveau l'activité catalytique du domaine kinase afin de favoriser la phosphorylation des effecteurs recrutés par la seconde vague (Furdui et al., 2006).

1.2.1.2. HER2 présente un mode d'activation unique

La famille de récepteurs aux facteurs de croissance épidermiques, HER ou ErbB comprend 4 membres chez l'humain : EGFR ou HER1, HER2, HER3 et HER4, encore appelés ErbB1-4 (Fig. 1.9) (Citri and Yarden, 2006). Les quatre récepteurs de la famille HER présentent une structure globale identique, dont la région extracellulaire présente 4 domaines, I-IV (Bajaj et al., 1987). Les domaines II et IV, riches en cystéines, sont à l'origine de la dimérisation des récepteurs de la famille HER (Burgess et al., 2003; Garrett et al., 2002; Ogiso et al., 2002).

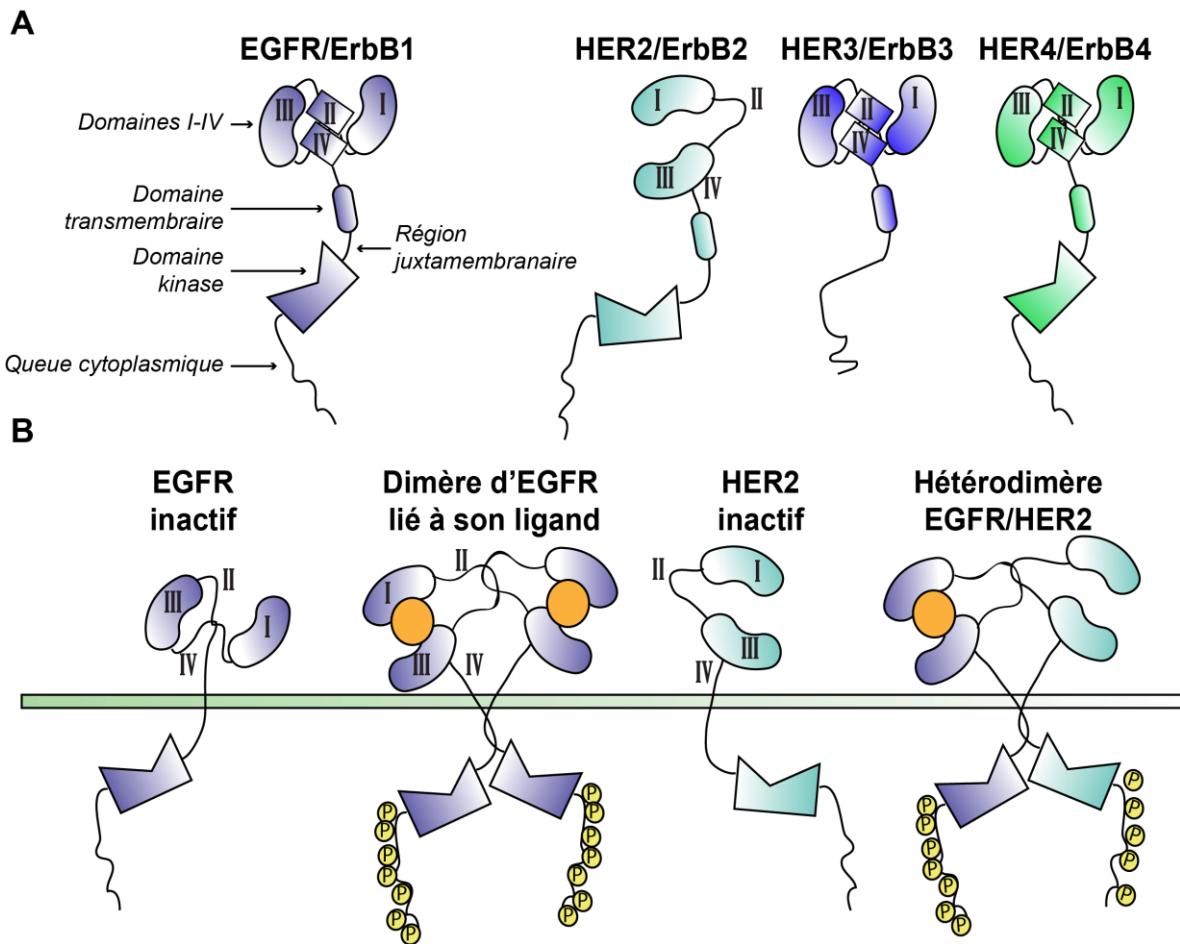


Figure 1.9 : Les 4 membres de la famille de RTK HER présentent une architecture similaire et sont capables d'homo- et d'hétérodimérisation.

A- Les RTK de la famille HER, EGFR/ErbB1, HER2/ErbB2, HER3/ErbB3 et HER4/ErbB4, sont constitués d'un domaine extracellulaire, d'une région transmembranaire unique et d'une région cytoplasmique. La partie extracellulaire présente 4 domaines (I-IV). À l'état

monomérique inactif, les domaines II et IV des récepteurs EGFR, HER3 et HER4 interagissent entre eux, inhibant la dimérisation et l'activation des récepteurs. Le domaine transmembranaire est constitué d'une hélice α transmembranaire unique. La partie cytoplasmique contient une région juxtamembranaire, le domaine tyrosine kinase pour les récepteurs EGFR, HER2 et HER4, ainsi que la queue cytoplasmique. B- La liaison d'un ligand aux récepteurs EGFR, HER3 et HER4 induit un changement conformationnel. Les domaines I et III, en entrant en interaction avec le ligand, libèrent les interactions auto-inhibitrices des domaines II et IV. Le bras de dimérisation dans le domaine II est alors disponible pour des interactions homotypiques inter-moléculaires dirigeant la dimérisation des récepteurs et l'activation subséquente du domaine kinase. Le récepteur HER2 ne présente pas d'interactions autoinhibitrices, et peut diriger la dimérisation en absence de ligand.

En absence de ligand, la dimérisation est inhibée et le récepteur est maintenu dans une conformation « fermée » par des interactions entre le domaine de dimérisation II et le domaine IV (Fig. 1.9A). La liaison d'un ligand à des résidus des domaines I et III entraîne une réorganisation drastique de l'architecture spatiale des domaines, relâchant l'inhibition induite par les domaines II et IV, conduisant ainsi à l'exposition du domaine de dimérisation, tel que présenté sur la figure 1.9B (Burgess et al., 2003; Garrett et al., 2002; Ogiso et al., 2002). Selon ce modèle, les récepteurs de la famille HER représentent une exception, puisque le ligand ne participe pas du tout à l'interface de dimérisation (Burgess et al., 2003; Garrett et al., 2002; Ogiso et al., 2002). En effet, la dimérisation des récepteurs HER est contrôlée par allostérie, la liaison du ligand facilitant l'interaction des deux bras de dimérisation entre eux (Bouyain et al., 2005; Cho and Leahy, 2002; Ferguson et al., 2003).

Le second membre de cette famille de RTK activés par allostérie, HER2, est caractérisé par un mode d'activation très particulier puisqu'aucun ligand biologique n'est connu pour ce récepteur à ce jour. Par ailleurs, sa structure ne présente pas une conformation fermée en absence de ligand comme les autres membres de la famille HER. À l'inverse, la forme monomérique non liée à un ligand de HER2 présente un bras de dimérisation qui s'étend à partir du domaine II, rappelant ainsi l'aspect des structures de EGFR, HER3 ou HER4 liés à leur ligand (Cho and Leahy, 2002; Garrett et al., 2003; Qiu et al., 2008; Zhang et al., 2006) (Fig. 1.9A).

La conformation « ouverte » de HER2 en absence de ligand en fait ainsi un récepteur dit « prêt-à-s'apparier » (Citri and Yarden, 2006). En effet, les quatre membres de la famille sont capables d'homo- comme d'hétérodimérisation, et HER2 représente le partenaire de dimérisation préférentiel des trois autres membres de la famille (Tzahar et al., 1996). Chacun

des dimères formés par deux récepteurs de la famille HER présente ainsi des différences quant à son activité catalytique et à ses sites de recrutement de protéines effectrices. Par exemple, il a été démontré que des homodimères de EGFR et de HER2 ainsi que l'hétérodimère EGFR/HER2 induisent le recrutement de SHC1 et GRB2, ainsi que l'activation de ERK et AKT (Muthuswamy et al., 1999). Cependant, seuls les homodimères de EGFR sont capables de recruter CBL et sont de ce fait internalisés, probablement en raison des différentes spécificités des kinases des deux récepteurs (Muthuswamy et al., 1999).

La capacité de HER2 à s'activer par homodimérisation reste cependant contestée. En effet, bien que l'homodimérisation de ce récepteur puisse être observée lors de la surexpression de son orthologue constitutivement actif chez la souris, ou lors de traitement par des anticorps bivalents ciblant la partie extracellulaire du récepteur, de nombreux travaux suggèrent que l'hétérodimérisation est majoritaire en conditions physiologiques (Harari and Yarden, 2000; Pinkas-Kramarski et al., 1996; Weiner et al., 1989). Il a par exemple été démontré que la surexpression de HER2 dans des cellules dépourvues d'autres membres de la famille HER ne conduit pas à l'activation de ce dernier, qui nécessite l'expression concomitante d'EGFR ou HER3 (Klapper et al., 1999).

L'existence de quatre membres de récepteurs de la famille HER, permettant ainsi en théorie la formation de 10 complexes différents (4 homodimères et 6 hétérodimères), est apparue plutôt tardivement dans l'évolution. En effet, le nématode et la drosophile possèdent une seule version d'un récepteur EGFR-*like*. Cette complexité est de ce fait considérée comme une évolution permettant une signalisation plus complexe et robuste, requise par l'évolution de la complexité des organismes (Harari and Yarden, 2000; Perrimon and Perkins, 1997). Il est suggéré qu'HER2 représente une évolution supplémentaire de la signalisation par les récepteurs HER, augmentant la robustesse de ce système en offrant une amplification positive du signal (Citri and Yarden, 2006).

1.2.2. Fonctions physiologiques de HER2

L'expression du premier membre de la famille HER, EGFR, a longtemps été considéré comme ubiquitaire, puisque son messager peut être détecté dans tous les tissus à des niveaux similaires (Groenestege et al., 2007). Cependant, les données récentes d'expression protéique de ce récepteur suggèrent que ce dernier présente une expression tissulaire plus restreinte (Human Protein Atlas, Uhlén et al., 2015)). Les autres membres de la famille, HER2, 3 et 4, montrent quant à eux une expression tissulaire restreinte au niveau protéique et de leurs messagers (Plowman et al., 1993; Prigent et al., 1992; Wang et al., 2004a). La protéine HER2 est détectée dans le tissu cardiaque, ainsi que dans le tissu épithelial mammaire, à des niveaux restreints à l'âge adulte (Jackson-Fisher et al., 2004).

Le récepteur EGFR, connu pour lier l'EGF, le TGF α , et l'amphiréguline (AREG), est essentiel au développement du tissu épithelial (Citri and Yarden, 2006; Sibilia et al., 1998). Le quatrième membre, HER4, est plus connu pour lier les neurégulines (NRG1, 2, 3 et 4) et est impliqué dans le développement cardiaque, du système nerveux central ainsi que de la glande mammaire (Citri and Yarden, 2006; Tidcombe et al., 2003). Les deux autres membres de cette famille sont plus atypiques. En effet, HER3 peut se lier à la NRG1 et 2 comme HER4, cependant son domaine kinase n'est pas actif. L'activation de HER3 requiert ainsi sa liaison à un ligand mais également son hétérodimérisation avec d'autres membres HER (Citri and Yarden, 2006; Guy et al., 1994). HER3 est impliqué dans le développement cardiaque et du système nerveux, notamment en favorisant la survie et la différenciation des précurseurs des cellules de Schwann chez l'embryon (Erickson et al., 1997; Riethmacher et al., 1997). Le second membre, HER2, joue un rôle dans le développement cardiaque, du système nerveux périphérique et de la glande mammaire, bien moins caractérisé que son implication dans le processus oncogénique (Andrechek et al., 2004; Jackson-Fisher et al., 2004; Lee et al., 1995; Morris et al., 1999).

De par sa structure et sa capacité à dimériser avec n'importe quel récepteur HER lié à son ligand pour former un dimère actif, HER2 constitue un régulateur positif majeur de la signalisation par les récepteurs HER (Pinkas-Kramarski et al., 1996). Ainsi, il est suggéré qu'il participe à certaines fonctions physiologiques régulées par les autres membres de la famille (Harari and Yarden, 2000). Par exemple, HER4 est impliqué dans la différenciation

du muscle cardiaque durant le développement embryonnaire et dans la régulation de la prolifération des cardiomyocytes par la suite, ainsi que dans le développement du système nerveux et de la glande mammaire (Tidcombe et al., 2003). Une autre étude a montré que HER2 est lui aussi essentiel à la formation cardiaque embryonnaire, sa délétion entraînant une mort embryonnaire avant E11, ainsi qu'au maintien de l'homéostasie cardiaque chez l'adulte (Negro et al., 2004). Par ailleurs, cette étude et d'autres travaux ont également mis en évidence des défauts de développement du système nerveux chez des souris *ErbB2*^{-/-} dans tous les tissus excepté le cœur (Negro et al., 2004; Woldeyesus et al., 1999). Ces fonctions communes de HER2 et HER4 dans le développement de certains systèmes argumentent ainsi pour un rôle de co-récepteur pour HER2 dans le développement et la signalisation protumorelle (Harari and Yarden, 2000). Le rôle de HER2 dans le développement de la glande mammaire à la puberté a de ce fait longtemps été supposé dépendant de ceux d'EGFR ou de HER4 (Sebastian et al., 1998). Cependant, des études de transplantation d'épithélia mammaires dans le tissu stromal d'animaux sauvages ou délétées de l'un de ces récepteurs ont démontré que HER2 est requis dans l'épithélium mammaire lors du développement pubertaire, tandis qu'EGFR est requis dans le stroma (Andrechek et al., 2004; Jackson-Fisher et al., 2004; Sebastian et al., 1998). De plus, la délétion de HER2 affecte l'elongation tubulaire et l'établissement de branchements latéraux de l'arbre épithélial lors de la croissance pubertaire de la glande mammaire (Andrechek et al., 2004; Jackson-Fisher et al., 2004). À l'inverse, l'altération de la fonction de HER4 conduit à des défauts de différenciation alvéolaire et de lactation lors de la période reproductive (Tidcombe et al., 2003). De plus, l'expression du récepteur HER3 n'est pas détectée dans la glande mammaire au stade pubertaire, confirmant les doutes initiaux de la communauté scientifique à l'égard de cette hypothèse (Schroeder and Lee, 1998).

Ces résultats suggèrent ainsi que HER2 possède des fonctions propres dans le développement de la glande mammaire. À l'inverse, il a été décrit qu'un des agents thérapeutiques ciblant HER2 dans le cancer du sein inhibe plus précisément la dimérisation de HER2 avec HER3 (Lee-Hoeftlich et al., 2008). Cet agent, le Pertuzumab, montre une efficacité biologique et clinique comparable à l'inhibiteur ciblé de HER2, le Trastuzumab, suggérant que le dimère HER2/HER3 est impliqué dans l'homéostasie de la glande mammaire (Baselga et al., 2010; Stern, 2008).

Ainsi, HER2 présenterait d'une part un rôle de tampon permettant de soutenir certaines fonctions cellulaires dépendantes de la signalisation par les récepteurs HER et renforçant ainsi la robustesse du système HER (Citri and Yarden, 2006), et d'autre part des fonctions signalétiques propres, notamment dans le développement de la glande mammaire. Cependant, les mécanismes moléculaires soutenant les rôles physiologiques de HER2 demeurent peu documentés, et pourraient permettre de mieux comprendre les fonctions signalétiques de HER2 dans l'homéostasie de la glande mammaire, et dans le processus oncogénique.

1.3. Le cancer du sein HER2+

Le récepteur HER2 est surexprimé dans 15-20% des cancers du sein, et sa surexpression a très rapidement été associée à un mauvais pronostic (Jackisch et al., 2017; Slamon et al., 1987). L'oncogenèse induite par HER2 correspond à un processus pathologique bien distinct des autres types de cancer du sein.

1.3.1. Découverte de l'oncogène HER2

Le récepteur HER2 a été impliqué pour la première fois dans la progression tumorale au début des années 80. L'équipe du Dr Weinberg avait mis en évidence la présence d'une glycoprotéine de 185 kDa dans des cellules de neuroblastomes induits chimiquement chez le rat, ainsi que dans des cellules NIH-3T3 transformées par transfection d'ADN issu de ces mêmes neuroblastomes (Schechter et al., 1984; Shih et al., 1981). Cette glycoprotéine, dénommée NEU en référence aux neuroblastomes qu'elle induit, présentait de fortes similarités d'une part avec le RTK EGFR, et d'autre part avec une protéine tumorigène induisant des sarcomes issue du virus de l'érythroblastose aviaire, ErbB (Schechter et al., 1984, 1985, Yamamoto et al., 1983a, 1983b). Il a par la suite été démontré que la protéine NEU identifiée dans ces études correspond en réalité à une forme du récepteur HER2 présentant une mutation ponctuelle changement de sens (V664E) dans son domaine transmembranaire, lui conférant une activité catalytique constitutive (Bargmann and Weinberg, 1988). Une étude indépendante a en parallèle identifié un gène similaire à EGFR,

nommé c-ErbB2, présent dans des extraits de carcinomes mammaires humains et dans des adénocarcinomes salivaires, soulignant ainsi son implication potentielle dans la tumorigenèse (King et al., 1985; Semba et al., 1985). L'identification de l'activité tyrosine kinase de HER2 a par la suite appuyé son appartenance à la famille de récepteurs HER, ou ErbB, dont EGFR est le premier membre (Akiyama et al., 1986). Le récepteur HER2 a été fonctionnellement impliqué dans l'oncogenèse mammaire humaine en 1987, dans une étude corrélant l'amplification de ce gène et la survie des patients, soulignant ainsi pour la première fois le pouvoir pronostic de cette amplification (Slamon et al., 1987). Il a par la suite été convenu de conserver les appellations suivantes : la notation ErbB concerne les gènes de la famille de récepteur de toutes les espèces, HER est utilisé pour les gènes humains, et NEU correspond au gène ErbB2 chez les rongeurs uniquement. La différenciation entre NEU sauvage et NEU V664E, parfois dénoté NEU ou NEU-NT, n'ayant pas bénéficié d'un consensus aussi strict, il est important de mentionner que l'appellation NEU ne sera employée ici que pour désigner la forme sauvage. De plus, afin de clarifier et d'alléger le texte, HER2 sera par la suite utilisé pour désigner la forme sauvage du récepteur indépendamment de l'espèce, en lieu de l'appellation HER2/ErbB2.

1.3.2. Pertinence clinique de la classification des cancers du sein

Les nombreuses études s'intéressant à la prise en charge des patientes atteintes de cancer du sein dénotent la grande diversité de ces pathologies (Malhotra et al., 2010; Neve et al., 2006; Perou et al., 2000; Sørlie et al., 2001). Il a ainsi été proposé que le cancer du sein ne soit pas considéré comme une seule maladie, mais plutôt comme un groupe de pathologies distinctes de par leur génétique, épigénétique, histopathologie et leur issue clinique (Vargo-Gogola and Rosen, 2007). La classification des différents cancers du sein est ainsi un outil essentiel pour la prise en charge des patientes. Ces différences affectent l'agressivité des tumeurs mammaires ainsi que leur réponse aux traitements, et doivent donc être prises en compte lors du diagnostic et de la sélection de la séquence thérapeutique (Goldhirsch et al., 2006). Par exemple, les traitements hormonaux tels que le tamoxifène ne sont bénéfiques qu'à certaines patientes atteintes de cancer du sein hormonaux-dépendants (Goldhirsch et al., 2006).

Historiquement, les cancers du sein étaient classifiés selon des paramètres cliniques et morphologiques, notamment le stade et le grade tumoral, le type histologique, le statut prolifératif et l'invasion des nœuds lymphatiques (Rakha and Green, 2017). La classification histologique des cancers du sein épithéliaux distingue ces derniers selon deux critères majeurs : l'origine anatomique des cellules cancéreuses et l'invasion des tissus environnants. Les cancers du sein seront donc qualifiés de carcinomes lobulaires (ou lobulocarcinomes) ou canalaires (ou ductocarcinomes) en fonction de leur origine histologique. Les tumeurs ne présentant pas de dégradation de la membrane basale environnante correspondent à des carcinomes *in situ*, tandis que celles montrant une dégradation de la membrane basale et une invasion des tissus environnants sont qualifiées d'infiltrantes. Ces critères permettent ainsi de différencier 4 grands types de cancer du sein : les ductocarcinomes *in situ* (DCIS), les lobulocarcinomes *in situ* (LCIS), les ductocarcinomes invasifs (IDC) et les lobulocarcinomes invasifs (ILC) (Malhotra et al., 2010). Les analyses histologiques permettent également de distinguer d'autres types de cancers du sein plus rares, comme les cancers du sein inflammatoires, la maladie de Paget, et les angiosarcomes mammaires (Société canadienne du cancer, Goldhirsch et al., 2011). Enfin, les analyses histologiques prennent également en compte la taille de la tumeur et la présence ou non de cellules cancéreuses dans les noeuds lymphatiques, paramètres importants à l'établissement du pronostic et à la sélection des thérapies (Goldhirsch et al., 2006). Il est généralement admis que cette classification, bien qu'offrant des variables pronostiques reflétant la biologie des tumeurs mammaires, ne corrèle pas avec la complexité des cancers du sein, et ne constitue pas un outil pronostique robuste (Rakha and Green, 2017).

D'un point de vue moléculaire, les tumeurs mammaires ont tout d'abord été divisées en trois grands groupes selon leur expression de trois récepteurs : les tumeurs hormono-dépendantes qui surexpriment le récepteur aux estrogènes et/ou à la progestérone (HR+ ou ER+/PR+), les tumeurs surexprimant HER2 (HER2+), et les tumeurs triple négatives qui ne surexpriment aucun de ces trois récepteurs (TN) (Goldhirsch et al., 2005). Cette classification permet d'apporter un diagnostic et un pronostic vital, et ainsi de sélectionner les outils thérapeutiques disponibles en s'adaptant au risque de décès (Prat et al., 2015). En effet, les tumeurs HR+ sont statistiquement moins agressives que les tumeurs HER2+, les TN représentant les tumeurs les plus agressives et les plus difficiles à traiter en clinique. De plus,

les thérapies hormonales telles que le tamoxifène ne sont efficaces que pour des tumeurs HR+, les inhibiteurs de HER2 tels que le Trastuzumab présentent un bénéfice thérapeutique uniquement pour les tumeurs HER2+. Enfin, les tumeurs mammaires TN sont plus sensibles aux agents de pontage de l'ADN tels que le cisplatine (Goldhirsch et al., 2007).

Cependant, ces signatures moléculaires ne sont pas exclusives. Par exemple, des tumeurs HR+ peuvent également surexprimer HER2. De plus, les tumeurs mammaires de chaque classe demeurent très variées, ce qui se traduit notamment par une prédiction erronée de la réponse aux traitements. Des analyses à haut débit du transcriptome d'un grand nombre de tumeurs mammaires, par la suite classifiées par des analyses se basant sur les dérégulations de certaines voies de signalisation cellulaire telles que PI3K/AKT, ont permis de décrire des signatures moléculaires intrinsèques à l'origine d'une nouvelle classification avec une meilleure corrélation avec les caractéristiques cliniques des patientes (Perou et al., 2000; Sorlie et al., 2003; Sørlie et al., 2001). Ces signatures ont amené les experts à proposer une classification des cancers du sein en 5 groupes : (1) luminal A, (2) luminal B, (3) enrichi en HER2, (4) basal, et (5) similaire au tissu mammaire normal. Ces catégories permettent de mieux prédire le pronostic vital des patients, mais également la réponse à certains traitements (Sørlie et al., 2001). Par exemple, les tumeurs mammaires luminales A présentent un meilleur pronostic vital que les tumeurs luminales B, et il a été mis en évidence que ces 2 classes de tumeurs bénéficient de façon statistiquement distincte de différents traitements tels que des agents cytotoxiques (Prat et al., 2015). Par la suite, des études similaires ont décrit une sixième classe de tumeurs mammaires, caractérisées par leur très faible expression de certaines protéines d'adhésion, dénotées pauvres en claudines (Herschkowitz et al., 2007; Sabatier et al., 2014). Malgré une meilleure corrélation de ces classifications avec les observations cliniques, ces classes renferment toujours une grande variabilité. De plus, il a été montré que l'attribution fiable d'une tumeur à l'une de ces classes nécessite minimalement l'évaluation du niveau d'expression de 50 gènes, réduisant ainsi l'applicabilité routinière de ces analyses en clinique (Prat et al., 2015). Cependant, ces classifications ont permis d'améliorer notre compréhension des différents cancers du sein, et ont participé à l'amélioration de la prise en charge des patientes, notamment pour les 4 classes principales, luminal A, luminal B, enrichi en HER2 et basal, (Polyak and Metzger Filho, 2012), représentées dans le tableau 1.1. Ainsi, le consensus de St Gallen 2017 propose de considérer

ces 4 classes de cancers mammaires lors du diagnostic, car leur discrimination permet d'améliorer la prise en charge des patientes (Curigliano et al., 2017).

Tableau 1.1 : Les 4 classes principales de cancer du sein et l'expression de certains récepteurs au sein de ces classes

	ER	PR	HER2
Luminal A	+/-	+/-	-
Luminal B	+/-	+/-	-
HER2+	-	-	+
Basal	-	-	-

Ces études, ainsi que les nombreux travaux s'attachant à la classification fonctionnelle des cancers du sein soulignent la nécessité de développer de meilleurs outils diagnostiques pour une meilleure prise en charge des patientes. Ainsi, les cancers du sein représentent des maladies pour lesquelles l'apport de la médecine personnalisée est le plus attendu, notamment pour le cancer du sein HER2+ (Gatza et al., 2010; Prat et al., 2015; Sotiriou and Piccart, 2007).

Le récepteur HER2 est surexprimé dans 15-20% des cas de cancer du sein, ainsi que dans certains cancers ovariens, utérins, gastriques et pulmonaires (Jackisch et al., 2017; Scholl et al., 2001). Des mutations activatrices de HER2 ont été mises en évidence dans le cancer du poumon, ainsi que dans quelques cas de cancer du sein (Lee et al., 2006; Stephens et al., 2004). La surexpression de HER2 est utilisée depuis les années 90 comme biomarqueur pour le diagnostic du cancer du sein HER2+ (Jackisch et al., 2017; Slamon et al., 1987). Ce diagnostic est déterminé en clinique par hybridation in situ de sondes fluorescentes dirigées contre le gène *ERBB2* (FISH) ou par immunomarquage du récepteur sur des biopsies (IHC) (Nitta et al., 2016; Shaaban et al., 2014). Le pronostic vital des patientes atteintes de cancer du sein HER2+ est inférieur à celui de patientes présentant un cancer du sein HR+, mais supérieur à celui de patientes atteintes de cancer triple négatifs (Goldhirsch et al., 2006).

La mise sur le marché dans les dernières années d'inhibiteurs ciblant HER2 tels que le Trastuzumab ont permis et d'augmenter de façon significative l'espérance de vie des patientes atteintes de cancer du sein HER2+ (Azambuja et al., 2014; Baselga et al., 2010; Esteva et al., 2002). Cependant, la résistance primaire ou acquise à ces thérapies est très

fréquente et il est estimé qu'après un an de traitement moins d'un tiers des patientes répondent encore à ces inhibiteurs en clinique (Baselga et al., 2010; Chung et al., 2013). Par conséquent, l'espérance de vie globale et en absence de progression de la maladie demeurent réduites chez les patientes atteintes de cancer du sein HER2+. De plus, la combinaison du Trastuzumab avec différents agents chimiothérapeutiques module grandement son efficacité thérapeutique, de même que la séquence thérapeutique et le nombre de cycles de thérapies effectués, compliquant l'évaluation du bénéfice thérapeutique et la mise en évidence de marqueurs prédictifs, permettant la prédiction de la réponse à un traitement. En effet, une étude récente a évalué le taux de réponse complète et partielle au Trastuzumab à 5% et 37% respectivement en première ligne de traitement, tandis que ces taux diminuent drastiquement en seconde ligne de traitement (1% et 10% de réponse complète et partielle respectivement), et qu'aucune réponse n'est observée à partir de la quatrième ligne de traitement (Li et al., 2016).

Il est donc nécessaire d'améliorer la compréhension des mécanismes moléculaires régissant la signalisation pro-tumorale dépendante de HER2 afin de proposer de nouveaux outils thérapeutiques et prédictifs.

1.3.3. Modèles d'étude du cancer du sein

L'hétérogénéité clinique des cancers du sein et des mécanismes régulant l'oncogenèse dans cette glande a forcé le développement de nombreux modèles d'étude, afin de récapituler au mieux les particularités de chacun des types de cancers mammaires ou bien leur hétérogénéité (Ursini-Siegel et al., 2007; Vargo-Gogola and Rosen, 2007).

1.3.3.1. Lignées cellulaires

Une proportion importante des découvertes concernant l'oncogenèse et la signalisation pro-tumorale provient d'études phénotypiques de différentes lignées cellulaires issues de glandes mammaires normales ou de tumeurs mammaires. Une étude a de plus démontré que la collection de lignées cellulaires de cancer du sein disponibles dans les années 2000, incluant la lignée HCC1954 dans laquelle nous avons effectué nos études, constituent des modèles d'études pertinents du cancer du sein, puisque leurs profils d'expression génique et protéique corrèlent avec ceux de tumeurs mammaires humaines (Neve et al., 2006). Cette étude a de plus démontré que ces lignées représentent des modèles adéquats pour la recherche de déterminants moléculaires, avec pour preuve de concept l'identification de marqueurs pronostics de résistance à la thérapie ciblée de HER2, le Trastuzumab (Neve et al., 2006). Cependant, cette étude a également mis en évidence des différences significatives entre lignées cellulaires et tumeurs humaines, par exemple dans le regroupement de certaines aberrations génétiques au sein des sous-groupes de cancers du sein, soulignant ainsi la nécessité de précaution quant aux résultats obtenus dans ces modèles d'études (Neve et al., 2006). La lignée de cancer du sein humain HCC1954 utilisée extensivement dans nos travaux est issue d'une tumeur primaire mammaire de 3cm^3 extraite d'une patiente de 61 ans atteinte d'un carcinome canalaire HER2+ sans invasion des nœuds lymphatiques, traitée par radiothérapie (Gazdar et al., 1998). Cette lignée est de plus intrinsèquement résistante aux inhibiteurs ciblés de HER2 en raison d'une mutation activatrice de la sous-unité catalytique A de la PI3K (PIK3CA) (Hanker et al., 2013; Weigelt et al., 2011). La lignée HCC1954 constitue ainsi un modèle d'étude du cancer du sein HER2+ aux propriétés prolifératives et métastatiques modérées.

De nombreuses études ont cependant mis en évidence les variations inter-laboratoire de différentes lignées cellulaires, notamment celles de cancer du sein. Ces divergences pourraient être à l'origine de biais lors de la comparaison de résultats de différents travaux (Burdall et al., 2003).

1.3.3.2. Modèle de transition épithélio-mésenchymateuse *in vitro*

La transition épithélio-mésenchymateuse constitue un des événements clés du processus métastatique, et différents modèles ont été mis au point pour étudier cet évènement clé. Le TGF β présente un rôle complexe dans la physiopathologie de la glande mammaire, notamment dans son oncogenèse (Berie and Moses, 2006; Pickup et al., 2013). En effet, le TGF β est impliqué d'une part dans l'inhibition de la prolifération cellulaire et des branchements latéraux des canaux épithéliaux lors du développement de la glande mammaire (Silberstein and Daniel, 1987), mais il est d'autre part impliqué dans l'agressivité des tumeurs mammaires, notamment dans leur potentiel métastatique (Dumont and Arteaga, 2000). *In vitro*, ces actions opposées du TGF β se traduisent par des effets anti-prolifératifs et pro-apoptotiques lors de traitements à faibles doses et sur des temps courts de cellules épithéliales de glande mammaire normale telles que les NMuMG (Gal et al., 2008). Un traitement à plus fortes doses ou sur une durée plus longue des mêmes cellules induit une augmentation de la prolifération, une diminution de l'apoptose, et l'acquisition de caractéristiques morphologiques typiques de cellules mésenchymateuses (Gal et al., 2008). Il a notamment été démontré que la suractivation du récepteur HER2 et l'activation conjointe du récepteur au TGF β (T β R-II) coopèrent *in vitro* pour augmenter les capacités migratoires et invasives de cellules mammaires (Northey et al., 2013; Seton-Rogers et al., 2004). Par la suite, il a été démontré dans plusieurs lignées cellulaires, dont les HCC1954, que le traitement par le TGF β de cellules surexprimant HER2 induit *in vitro* un changement phénotypique ressemblant à la transition épithélio-mésenchymateuse, caractérisée par un changement important de la morphologie cellulaire, l'augmentation des capacités migratoires et invasives, la diminution d'expression de marqueurs épithéliaux et l'augmentation de certains marqueurs mésenchymateux (Gal et al., 2008; Galliher and Schiemann, 2007; Ngan et al., 2013).

La coopération entre HER2 et le TGF β observée *in vitro* est biologiquement pertinente, puisqu'il a été démontré dans des modèles murins que cette coopération inhibe la croissance de tumeurs primaires tout en augmentant la formation de métastases pulmonaires (Siegel et al., 2003). Ce modèle constitue ainsi un essai pertinent pour caractériser les déterminants moléculaires de la transition épithélio-mésenchymateuse dans des conditions contrôlées.

1.3.3.3. Culture 3D et formation d'acini

Le microenvironnement est source de nombreux signaux régulateurs de l'homéostasie et de la différenciation cellulaires (Bissell et al., 2002). Le rôle du microenvironnement est particulièrement important dans la glande mammaire, où l'adhésion cellulaire à la matrice et la composition de cette dernière jouent des rôles prépondérants dans la survie, la prolifération et la différenciation (Barcus et al., 2013; Bissell et al., 2002; Galbaugh et al., 2010). Ces processus ne sont pas maintenus dans les lignées épithéliales mammaires normales et cancéreuses cultivées *in vitro*, mais peuvent être restaurés par la culture cellulaire en 3D dans des matrices riches en laminines (Bissell et al., 2005). Dans ces conditions, des cellules normales non transformées forment des structures ressemblant aux acini mammaires, caractérisées par la polarisation cellulaire et l'arrêt de la prolifération (Petersen et al., 1992). À l'inverse, des cellules cancéreuses cultivées dans ces conditions forment des colonies désorganisées, non polarisées et hautement prolifératives (Petersen et al., 1992). Ce modèle de culture cellulaire permet ainsi de maintenir l'intégration des différents systèmes de signalisation tout en retenant la possibilité d'application dans un laboratoire de biologie cellulaire (Wang et al., 2002).

1.3.3.4. Modèles murins

Les deux modèles les plus répandus dans le contexte du cancer du sein HER2+ sont les modèles transgéniques d'une part, et les injections de cellules tumorales chez la souris immuno-déficiente.

1.3.3.4.1. Modèles transgéniques

La modification génique consistant à introduire une version exogène du récepteur HER2 dans la glande mammaire de souris sauvages est un modèle qui a pu apporter de nombreuses connaissances quant aux mécanismes régulant la progression tumorale induite par HER2.

Le premier modèle murin de la sorte, MMTV-NEU-NT, dans lequel l'expression tissu-spécifique d'une forme constitutivement active de l'orthologue de HER2 chez le rat est dirigée par le virus MMTV, a par exemple permis de démontrer que la suractivation de ce récepteur est suffisante à l'initiation de tumeurs mammaires (Muller et al., 1988). Par ailleurs, le modèle murin de cancer mammaire, induit par l'expression de l'antigène T moyen du virus du polyome dans ce système (PyMT-MMTV), conduit à l'établissement de tumeurs mammaires hautement métastatiques. Ces tumeurs sont caractérisées par une surexpression marquée du récepteur ErbB2, bien qu'il n'ait pas été démontré clairement que cette surexpression participe à l'initiation tumorale dans ce modèle (Lin et al., 2003). Par la suite, il a été démontré que l'expression sous le même promoteur MMTV de HER2 ou de NEU sauvages ne conduit à la formation de tumeurs mammaires qu'après une longue période de latence (Guy et al., 1992). De plus, les tumeurs ainsi développées présentent des mutations activatrices de HER2, suggérant ainsi que chez la souris, la surexpression de HER2 n'est pas suffisante à son activation et à l'initiation de la tumorigénèse, à l'inverse des observations cliniques de tumeurs mammaires HER2+ humaines (Finkle et al., 2004; Guy et al., 1992; Piechocki et al., 2003; Siegel et al., 1994). De façon intéressante, le promoteur MMTV le plus couramment utilisé dans les modèles murins transgéniques est sous influence hormonale de la progestérone et de la testostérone, à l'inverse du promoteur endogène de HER2 (Otten et al., 1988). Un modèle permettant l'expression de la forme constitutivement active de HER2, NEU-NT, sous le contrôle du promoteur endogène a toutefois été décrit (Andrechek

et al., 2000). Dans ce modèle, la formation de tumeurs mammaires survient après une période de latence plus importante que pour les modèles MMTV. De plus, toutes les tumeurs ainsi formées présentent une augmentation du nombre de copies du gène HER2, suggérant que l'expression d'une forme constitutivement active de HER2 sous le contrôle de son promoteur endogène n'est pas suffisante à l'initiation tumorale (Andrechek et al., 2000). Plus récemment un modèle inductible a également été décrit, dans lequel l'expression de NEU-NT est sous le contrôle de MMTV et de l'élément régulateur de la tétracycline, permettant l'expression restreinte au tissu mammaire du récepteur, uniquement en présence de doxycycline (Moody et al., 2002). Ce modèle a d'ailleurs démontré que l'activation de HER2 est requise non seulement à l'initiation tumorale mais également à sa maintenance, ainsi qu'au processus métastatique (Moody et al., 2002).

Ces modèles d'expression permettent ainsi d'étudier la signalisation dépendante de HER2 et son implication dans la tumorigénèse mammaire. Toutefois, des différences significatives entre l'oncogenèse mammaire HER2+ murine et humaine limitent la pertinence de ces outils en tant que modèles de l'oncogenèse mammaire HER2+ humaine (Ursini-Siegel et al., 2007).

1.3.3.4.2. Xénogreffes

Les xénogreffes de cellules tumorales humaines ou murines chez des souris immuno-déficientes représentent des modèles très prisés pour l'étude de mécanismes moléculaires participant à la progression tumorale. Cette méthodologie permet effectivement de coupler l'étude de cellules cancéreuses *in vitro* avec des analyses dans un environnement *in vivo* (Vargo-Gogola and Rosen, 2007). On retrouve parmi ces méthodes de xénogreffes l'injection sous-cutanée de cellules tumorales et la transplantation orthotopique de cellules tumorales dans le tissu adipeux de la glande mammaire (Vargo-Gogola and Rosen, 2007). L'injection de cellules tumorales dans la veine caudale est un autre modèle d'injection de cellules tumorales mammaires qui est souvent considéré comme distinct des xénogreffes, bien que répondant à la définition de ces dernières. En effet, cette méthode est utilisée depuis près de 30 ans afin de suivre le processus métastatique, notamment le tropisme cellulaire, tandis que les deux premières permettent de plus l'étude de la formation de tumeurs primaires et des interactions stroma-tumeur (Gilbert and Gordon, 1983; Vargo-Gogola and Rosen, 2007).

L'amélioration des techniques de transplantation et des stratégies d'humanisation de lignées de souris ont également permis dans les dernières années de développer les modèles de transplantation de biopsies tumorales de patients chez la souris, et ont rendu ce modèle très utile pour la caractérisation de l'hétérogénéité tumorale et de la réponse aux traitements (Byrne et al., 2017). L'injection orthotopique représente le modèle se rapprochant le plus de l'oncogenèse mammaire humaine puisque les interactions microenvironnement-tumeur impliquent les composants spécifiques de la glande mammaire, tels que les adipocytes. Cependant, les différences entre les glandes mammaires murine et humaine, comme la composition fibreuse et adipocytaire, ou encore les variations dans la dépendance aux hormones limitent la portée de ce modèle (Hovey et al., 1999). De plus, la nécessité d'utiliser des souris au système immunitaire compromis pour ces études accroît les risques de biais. En effet, de nombreuses études soulignent le rôle du système immunitaire dans la surveillance anti-tumorale, ainsi que dans la progression tumorale, (Balkwill et al., 2005; Hanahan and Weinberg, 2011). Ces modèles sont donc hautement pertinents dans la recherche de nouveaux mécanismes impliqués dans la progression tumorale du cancer du sein mais demeurent limités dans leur capacité à modéliser fidèlement l'oncogenèse mammaire humaine.

De nombreux outils sont disponibles pour la modélisation et l'étude de l'oncogenèse mammaire HER2+ humaine. Chacun de ces modèles présente des avantages ainsi que des limitations, et différentes études suggèrent qu'une approche intégrant plusieurs modèles permettrait de s'affranchir des biais dépendants de chaque système (Byrne et al., 2017; Ursini-Siegel et al., 2007; Vargo-Gogola and Rosen, 2007). Ces modèles ont notamment permis d'étudier l'oncogenèse du cancer mammaire HER2+, depuis les mécanismes régulant son initiation, jusqu'au développement des thérapies ciblées de HER2 actuellement utilisées en clinique.

1.3.4. Mécanismes d'activation de HER2 dans le cancer mammaire

Les études portant sur l'oncogénicité de HER2/NEU dans des modèles animaux ont mis en évidence des mutations activatrices du récepteur, telles que la mutation V664E identifiée lors de l'identification du gène (Shih et al., 1981). Par la suite, il a été démontré que la forme sauvage du récepteur ne conduit à la formation de tumeurs qu'après une longue période de latence, et les tumeurs ainsi formées présentent systématiquement des mutations activatrices de HER2, notamment via la délétion de résidus du domaine extracellulaire stabilisant la forme dimérique du récepteur (Guy et al., 1992; Siegel and Muller, 1996; Siegel et al., 1994). Cependant, ces mutations ne sont pas observées en clinique dans le cancer mammaire HER2+ humain. En réalité, très peu de mutations de HER2 ont été mises en évidence en clinique, et ces dernières ne sont observées que dans moins de 1% des cas de cancer du sein HER2+ (Kauraniemi et al., 2003; Lee et al., 2006; Stephens et al., 2004). Dans la majorité des cas (99%), l'activation du récepteur HER2 est causée par une amplification du locus 17q12-q21 contenant le gène *ERBB2*, causant ainsi la surexpression de sa forme sauvage (Kauraniemi et al., 2003). De plus, la transcription et la traduction de HER2 est régulée par différents facteurs parfois dérégulés dans le cancer du sein (Vernimmen et al., 2003a). Par exemple, le facteur de transcription AP2 participe à l'augmentation de la transcription du gène *ERBB2* spécifiquement dans les cancers mammaires (Vernimmen et al., 2003b). Un autre facteur de transcription, EGR2, ne lie et n'active la transcription du gène qu'en absence du suppresseur de tumeur 14-3-3 σ (SFN) (Dillon et al., 2007). Enfin, STAT3, connu pour augmenter la transcription du gène codant pour HER2 (*ERBB2*), est activé en aval du RTK (Dillon et al., 2007).

En sus de la duplication du locus génomique contenant le gène *ERBB2* observée dans la majorité des cas de cancer du sein HER2+, des mécanismes d'épissage et d'initiation de la traduction alternatifs régulent l'expression de différents isoformes de HER2, qui participent parfois au processus oncogénique. Un des isoformes issus d'épissage alternatif, dénommé $\Delta 16$ HER2, présente une délétion de 16 résidus dans la région juxtamembranaire du récepteur (Kwong and Hung, 1998). Sa structure est très similaire aux formes mutées du récepteur observées dans les tumeurs mammaires dans les modèles murins (Kwong and Hung, 1998; Siegel et al., 1999). Cette délétion incluant des résidus cystéines impliqués dans la

stabilisation du monomère par des ponts disulfures intramoléculaires favorise l'homodimérisation et sa stabilisation via des ponts intermoléculaires (Kwong and Hung, 1998; Siegel et al., 1999). Cet isoforme présente de ce fait une activité supérieure au récepteur sauvage et induit une transduction du signal en absence de stimulation par des ligands des récepteurs de la famille HER (Kwong and Hung, 1998; Siegel et al., 1999). Bien que sa production soit parfois observée en conditions physiologiques, il est suggéré que ce transcrit soit augmenté dans près de la moitié des cancers du HER2+, et que son expression favorise la progression tumorale *in vitro* et *in vivo* (Castiglioni et al., 2006; Kwong and Hung, 1998; Mitra et al., 2009; Siegel et al., 1999). $\Delta 16$ HER2 est associé en clinique avec des cancers du sein HER2+ localement disséminés aux nœuds lymphatiques (Mitra et al., 2009). De plus, la délétion cause la perte de l'épitope reconnu par le Trastuzumab, rendant cette thérapie inefficace (Castiglioni et al., 2006; Mitra et al., 2009). Des mécanismes d'initiation alternative de la traduction ou de clivage protéolytique sont de plus à l'origine de trois autres variants de HER2 dont le domaine extracellulaire est fortement réduit ou manquant : p110, p95cyto et p95m (Chandarlapaty et al., 2009; Pedersen et al., 2009; Tsé et al., 2012). Ces trois variants, de par l'absence de leur domaine extracellulaire, sont capables d'homodimériser et d'être activés de façon constitutive (Chandarlapaty et al., 2009; Pedersen et al., 2009; Tsé et al., 2012). Le variant p110 a de plus été montré régulateur positif de la transcription de gènes impliqués dans le processus métastatique, tandis que p95m est insensible au Trastuzumab et associé à un mauvais pronostic en clinique (Chandarlapaty et al., 2009; Pedersen et al., 2009; Tsé et al., 2012; Ward et al., 2013).

L'épissage alternatif de HER2 peut également mener à la production de 2 protéines sécrétées, Herstatine et p100. Le rôle de ces dernières dans la progression tumorale n'est pas caractérisé en détail, mais elles constitueraient des facteurs inhibiteurs de la progression tumorale, par leur capacité à dimériser avec HER2 WT ou $\Delta 16$ HER2 sans initier de transduction de signal (Aigner et al., 2001; Hu et al., 2005).

La surexpression et la suractivation du récepteur HER2 soutient le processus oncogénique par de nombreux mécanismes. En effet, HER2 est un oncogène puissant impliqué dans l'initiation tumorale mais aussi dans le processus métastatique (Jackisch et al., 2017).

1.3.5. Signalisation pro-tumorale induite par HER2

1.3.5.1. La suractivation de HER2 soutient la prolifération et la survie cellulaires via l'activation aberrante de ERK et PI3K/AKT

Les mécanismes soutenant l'oncogénicité de HER2 ont été l'objet d'un grand nombre de travaux depuis les années 80. Ce récepteur a tout d'abord été lié à la signalisation mitogénique, puisque la surexpression de sa forme activée favorise la prolifération cellulaire et la croissance sans ancrage sur substrat (Dankort et al., 1997; Schechter et al., 1984; Shih et al., 1981; Siegel et al., 1994). Différentes études menées dans des modèles de cancer du sein *in vivo* chez le rat ou la souris ont permis d'éclaircir le rôle de l'activation de HER2 dans l'oncogenèse mammaire. Il a ainsi été montré pour la première fois chez la souris que l'activation de ce récepteur est suffisante à l'initiation tumorale (Muller et al., 1988), qu'elle est requise pour le maintien de la tumeur ainsi formée, ainsi que pour la formation de métastases pulmonaires (Bouchard et al., 1989; Moody et al., 2002; Muller et al., 1988). La caractérisation des déterminants moléculaires du rôle oncogénique du récepteur a mis en évidence l'implication des 5 sites d'autophosphorylation alors identifiés dans la transformation tumorale, nommés YA à YE en fonction de leur position par rapport à l'extrémité N terminale de la protéine (Fig. 1.10).

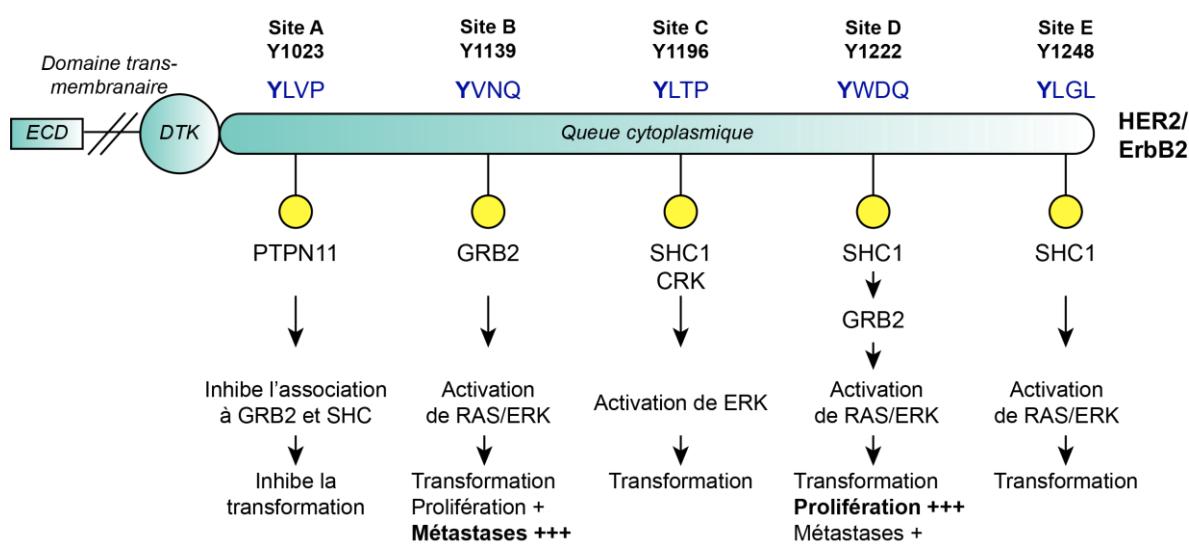


Figure 1.10 : Le récepteur HER2 présente 5 sites d'autophosphorylation participant à son action oncogénique.

Le récepteur HER2 présente un domaine extracellulaire (ECD), une hélice transmembranaire, un domaine tyrosine kinase (DTK), et une queue cytoplasmique, représentés sans échelle de taille sur ce schéma. La queue cytoplasmique du récepteur HER2 contient 5 sites d'autophosphorylation importants sur tyrosine, notés au dessus du schéma du récepteur. Les trois résidus en aval de la tyrosine sont indiqués en bleu en dessous de chaque site. Chacun peut interagir avec différents effecteurs. Le site A a été décrit pour son interaction avec PTPN11 dans une analyse à haut débit, et sa mutation pour un résidu non phosphorylable augmente le potentiel oncogénique de HER2. Le site B est connu pour interagir directement avec GRB2, et promouvoir la formation de tumeurs primaires et de métastases pulmonaires. Le site D est quant à lui connu pour interagir directement avec SHC, et indirectement avec GRB2. Il est impliqué dans la formation de tumeurs primaires. Les sites C et D ont été décrit pour leur interaction à SHC dans une étude à haut débit, cependant il n'a pas été démontré que ces derniers interagissent avec SHC dans des études plus ciblées.

En effet, ces travaux ont démontré que les sites de phosphorylation YB, YC, YD et YE soutiennent l'activation de ERK. Les sites YB et YD permettent le recrutement de GRB2, de manière directe (YB) ou indirecte via SHC1 (YD), assurant ainsi le recrutement membranaire de SOS et l'activation de RAS/MAPK (Dankort et al., 2001, 1997). Le site YE interagit avec SHC1 et permet également l'activation de RAS/MAPK (Dankort et al., 2001, 1997; Schulze et al., 2005). Enfin, le site YC interagit avec SHC1 et CRK (Dankort et al., 2001, 1997; Schulze et al., 2005), et permet l'activation de la voie ERK (Dankort et al., 2001, 1997). Ces sites de phosphorylation, leurs partenaires protéiques et leur activation aberrante de ERK soutiennent la transformation cellulaire de façon dépendante de l'activation de RAS pour les sites YB, YD et YE, et de façon indépendante pour le site YC (Dankort et al., 2001, 1997). À l'inverse, le site YA, qui est connu pour interagir avec la phosphatase PTPN11 (Schulze et al., 2005), diminue l'interaction du récepteur avec GRB2 et SHC1, inhibe l'activation de ERK et le potentiel tumorigène de HER2 (Dankort et al., 2001, 1997). L'établissement de l'expression dans l'épithélium mammaire murin de mutants de NEU catalytiquement actifs de façon constitutive (NEU NT), mais qui ne possèdent que le site de phosphorylation YB ou YD, a permis à cette équipe de démontrer que ces deux sites sont également capables indépendamment de soutenir l'initiation et la progression tumorale *in vivo* (Dankort et al., 2001). Cependant ces deux mutants ne conduisent pas exactement au même phénotype puisque le site YB soutient l'établissement de métastases pulmonaires de façon beaucoup plus conséquente que le site YD, suggérant que ces deux sites, et par extension GRB2 et

SHC1, jouent des rôles primordiaux et distincts dans la signalisation oncogénique de HER2 (Dankort et al., 2001)..

Il a de plus été décrit que dans ce contexte, la suractivation de l'orthologue de HER2 NEU-NT conduit en aval de ERK à l'activation de ETS2, facteur de transcription impliqué dans le contrôle du cycle cellulaire et régulant notamment la transcription de la cycline D1 (Dankort et al., 2001). L'activation de ERK par la signalisation HER2-dépendante est responsable de l'activation de nombreux autres facteurs de transcription tels que FOS, AP1 ou ELK1, responsables du contrôle de la transcription de gènes cibles impliqués dans la prolifération, la croissance, la survie, la différenciation, ou encore la migration cellulaire (Aksamitiene et al., 2012; Kasza, 2013; Romeo et al., 2012)

Outre l'activation de ERK, HER2 est aussi responsable de l'activation de la voie PI3K/AKT, via le recrutement membranaire de la sous-unité régulatrice PIK3R1 (Peles et al., 1992). Ce recrutement permet l'activation de la PI3K à la membrane, et ainsi la phosphorylation de PIP2 en PIP3, eux-mêmes responsables du recrutement membranaire et de l'activation subséquente d'AKT. L'activation de cette voie participe elle aussi à la promotion de la survie, de la croissance, et de la prolifération cellulaires (Aksamitiene et al., 2012; Castaneda et al., 2010). De plus, il a été suggéré que HER2 régule l'expression du troisième isoforme d'AKT (AKT3), fort stimulateur de la prolifération cellulaire (Grabinski et al., 2014).

En sus du recrutement de protéines effectrices soutenant ses fonctions tumorales, HER2 peut également hétérodimériser avec EGFR, HER3 et HER4, tel que discuté dans la section 1.2, et ainsi déréguler des fonctions dépendantes de ces récepteurs. Les dimères ainsi formés ne sont pas identiques d'un point de vue signalétique, et leur activation soutient différents aspects de la tumorigénèse (Pinkas-Kramarski et al., 1996; Stern, 2008). Par exemple, il a été démontré que le dimère EGFR/HER2 n'est pas ubiquitinylé et internalisé comme l'homodimère d'EGFR, ce qui induit ainsi une activation plus soutenue de la signalisation en aval (Sorkin et al., 1993). Le dimère HER2/HER3 conduit quant à lui à une activation très importante de la voie PI3K/AKT, puisqu'il est suggéré que HER2 ne présente pas de site de recrutement pour la PI3K, tandis que HER3 en possède 7 (Schulze et al., 2005; Soltoff et al., 1994; Sorkin et al., 1993). De plus, HER3 est très fortement exprimé dans la glande mammaire et fréquemment surexprimé dans des tumeurs HER2+ humaines, suggérant que

ce dernier participe de façon prépondérante à la signalisation pro-tumorale de HER2 (Siegel et al., 1999).

Ainsi, l'activation de ERK et de PI3K/AKT en aval de HER2 et des partenaires de dimérisation promeut l'oncogenèse mammaire, en soutenant notamment une prolifération et une survie cellulaires aberrantes.

1.3.5.2. Le dialogue de HER2 avec d'autres voies de signalisation participe à l'initiation tumorale et au processus métastatique

HER2 est impliqué dans le dialogue avec différentes voies de signalisation et récepteurs, participant ainsi plus largement à la progression tumorale. Il peut effectivement former des complexes signalétiques avec des récepteurs n'appartenant pas à la famille HER qui agissent alors en tant que co-récepteurs. Par exemple, HER2 immunoprécipite avec le récepteur de la leptine LEPR, et il a été montré que la leptine, peptide hormonal synthétisé par les adipocytes, stimule la phosphorylation et l'activation de HER2 ainsi que l'activation de la voie RAS/MAPK de façon dépendante d'EGFR et JAK2 (Eisenberg et al., 2004; Fiorio et al., 2008). Ce croisement de voies de signalisation est particulièrement important dans la glande mammaire dont le microenvironnement contient de nombreux adipocytes, qui participent activement à la progression tumorale (Bochet et al., 2013; Wang et al., 2012). Il a ainsi été suggéré que LEPR participe à la suractivation de ERK dans le cancer mammaire HER2+ (Dittrich et al., 2014).

HER2 et EGFR peuvent également interagir avec la partie C-terminale de la glycoprotéine membranaire MUC1, et cette association promeut l'import nucléaire de MUC1 avec son partenaire γ -caténine (Kufe, 2013; Li et al., 2003). Il a été démontré que MUC1 nucléaire participe à la régulation de la transcription des gènes cibles de WNT, impliqués dans la prolifération cellulaire ainsi que dans la transition épithélio-mésenchymateuse (Gangopadhyay et al., 2013; Huang et al., 2003; Micalizzi et al., 2010).

De plus, HER2 régule l'activité et/ou l'expression de protéines primordiales à d'autres voies de signalisation, et ce dialogue participe dans certains cas à la progression tumorale. En effet, il a très tôt été observé en clinique que l'expression des récepteurs aux estrogènes α et β (ESR1 et ESR2 respectivement) et de HER2 (Konecny et al., 2003) corrèle

négativement. Il a par la suite été démontré que l'activation de HER2 inhibe l'activité de ESR2 et l'expression de ESR1, via l'activation de la voie RAS/MAPK et PI3K/AKT, respectivement (Creighton et al., 2006; Oh et al., 2001; St-Laurent et al., 2005). À l'inverse, ESR1 peut quant à lui diminuer l'expression de HER2 (Creighton et al., 2006; Oh et al., 2001; St-Laurent et al., 2005). Ce phénomène est ainsi suggéré comme à l'origine de la résistance aux thérapies ciblées, l'inhibition d'un des acteurs levant l'inhibition exercée sur l'autre et initiant le changement de HER2+/ER- à HER2-/ER+ ou vice versa (Giuliano et al., 2013).

Il a par ailleurs été démontré que HER2 inhibe l'expression d'IGFBP3, augmentant ainsi la sécrétion d'IGF1 et la signalisation pro-proliférative d'IGFR (Worthington et al., 2010).

Le dialogue entre HER2 et la voie du TGF β ainsi que des intégrines est également impliqué dans la progression tumorale, et plus particulièrement dans le processus métastatique. En effet, il a été démontré que le TGF β induit la transition épithélio-mésenchymateuse de cellules mammaires surexprimant l'orthologue de HER2 NEU suractivé de façon dépendante de la phosphorylation de ce RTK (Northey et al., 2008, 2013).

De plus, il a été suggéré que le récepteur au TGF β une fois activé soit responsable de l'activation de la PI3K et du recrutement d'actine et d'actinine au récepteur HER2 (Wang et al., 2006). Le complexe HER2/actine/actinine serait alors responsable de l'activation localisée de RAC1 aux protrusions membranaires via le recrutement de PAK1, RAC1 et VAV2, ainsi que de la protection contre l'anoïkose via la phosphorylation de régulateurs de l'apoptose régulée par RAC1 (Wang et al., 2006). Une autre étude a également mis en évidence un lien entre HER2, des acteurs du remodelage du cytosquelette et l'anoïkose radio-induite (Hou et al., 2016). Dans cette étude, il a été démontré que la surexpression de HER2 induit l'activation de FAK et une augmentation de l'expression de protéines associées à la transition épithélio-mésenchymateuse, conférant aux cellules tumorales HER2+ une radioprotection qui peut être inhibée *in vitro* par des inhibiteurs de FAK (Hou et al., 2016). Il a par ailleurs été mis en évidence que les enzymes de clivages des pro-ligands EGF, les TACE (*TNF α Converting Enzyme*) comme ADAM17, peuvent être phosphorylées et donc activées par traitement au TGF β (Wang et al., 2009). La voie du TGF β participerait ainsi à l'activation soutenue de la signalisation dépendante de HER (Wang et al., 2009). Cette étude a de plus démontré que l'activation du récepteur au TGF β induit la formation d'agrégats de

HER2 et d'intégrines via l'activation de SRC et FAK. Ces agrégats permettent l'association de HER2 avec des éléments du cytosquelette et régulent ainsi la motilité cellulaire (Wang et al., 2009). L'association de la tyrosine phosphatase membranaire PTPRA avec la voie HER2 a également été soulignée. En effet, dans des cellules épithéliales mammaires, la déplétion de PTPRA conduit à une augmentation de la phosphorylation de FAK dépendant de HER2, ainsi qu'à un accroissement de la motilité cellulaire (Boivin et al., 2013).

HER2 a également été décrit comme activateur de certaines STAT telles que STAT1, STAT3 et STAT5 (Han et al., 2013; Qian et al., 2006; Raven et al., 2011; Ward et al., 2013). STAT1 est plutôt connu pour son rôle anti-tumoral et pro-apoptotique, tandis que STAT5 promeut la migration et l'invasion cellulaire et pourrait ainsi participer à la progression tumorale dépendante de HER2 (Koromilas and Sexl, 2013; Ward et al., 2013).

Il a de plus été mis en évidence que HER2 et EGFR interagissent directement avec la β -caténine et la plakoglobine, et l'activation de ces récepteurs conduit à la phosphorylation et à l'inhibition des caténines, provoquant la dissémination de cellules cancéreuses par dégradation de l'adhésion cellule-cellule (Kanai et al., 1995). Une autre étude a démontré que l'activation de HER2 induit une perte de polarité de cellules épithéliales, associée à la relocalisation de la E-cadhéchine, ainsi qu'à la dispersion et la migration cellulaires. Cette étude a déterminé que ce processus dépend des sites de phosphorylation YC, YD, et YE de HER2 ainsi que de l'activation des kinases MEK1 et/ou MEK2 (Khoury et al., 2001).

Enfin, différentes études ont démontré que la surexpression de HER2 augmente la sécrétion de facteurs pro-angiogéniques tels que le TGF- α ou le VEGF, liant ainsi l'activation de HER2 à l'angiogenèse nécessaire à la progression de la tumeur, et conférant à son inhibiteur, le Trastuzumab, une action anti-angiogénique (Izumi et al., 2002; Xiong et al., 2001; Yen et al., 2000, 2002).

Le récepteur HER2 constitue ainsi un oncogène particulier, puisqu'il contrôle la prolifération cellulaire, mais également la migration, la résistance à l'apoptose ou encore l'angiogenèse. De par ses interactions avec différentes voies de signalisation, des facteurs de croissance, des cytokines ou encore des molécules d'adhésion cellule-cellule ou cellule-matrice extracellulaire, une hypothèse pourrait être que ce récepteur constitue un mécanisme d'intégration de la signalisation par les récepteurs HER dans le contexte cellulaire de la glande mammaire, expliquant ainsi l'agressivité des cancers du sein HER2+. Ces dialogues

entre voies signalétiques, primordiales tant à la fonction physiologique qu'à l'oncogénicité de HER2, reposent majoritairement sur des interactions protéine-protéine et permettent l'ancrage des voies de signalisation HER2-dépendantes dans un vaste réseau signalétique, dont toutes les composantes participent potentiellement à la progression tumorale HER2+.

1.3.6. Inhibiteurs de HER2 : mécanismes d'action et de résistance

Étant donné le rôle central de HER2 dans certains cancers du sein et le mauvais pronostic associé à cet oncogène, de nombreux inhibiteurs ont été développés, et les plus prometteurs ont été testés en clinique et/ou approuvés dans la prise en charge des patientes atteintes de cancers du sein HER2+ (tableau 1.2).

Tableau 1.2 : Tableau récapitulatif des traitements ciblés de HER2 approuvés dans le traitement du cancer du sein HER2+.

Inhibiteur	Nom commercial	Cible(s)	Mécanisme d'inhibition
Trastuzumab	Herceptin	HER2	Anticorps monoclonal
Pertuzumab	Perjeta	HER2/HER3	Anticorps monoclonal
Lapatinib	Tykerb	HER2 et EGFR	Inhibiteur de kinase
Trastuzumab-Emtansine	Kadcyla	HER2	Agent cytotoxique

Le Trastuzumab est un anticorps monoclonal humanisé dirigé contre le domaine extracellulaire de HER2, inhibant la dimérisation du récepteur et de ce fait la transduction du signal en aval (Fendly et al., 1990; Lewis et al., 1993). Les données d'études pré-cliniques, cliniques ainsi que des travaux menés dans différents modèles ont permis de proposer plusieurs mécanismes d'action de cet agent. La pertinence de chacun dans le cancer du sein HER2+ demeure débattue; cependant, il est très probable que tous ces mécanismes participent réellement, dans différentes proportions, à l'action du Trastuzumab. L'un des premiers mécanismes décrits est celui de la cytotoxicité dépendante des anticorps ou ADCC (pour *Antibody-Dependant Cell-mediated Cytotoxicity*). Dans l'étude clinique pilote, il avait effectivement été relevé que les tumeurs traitées par le Trastuzumab en néoadjuvant présentaient une forte infiltration lymphoïde, et que cette activité ADCC corrélait avec la réponse initiale à la thérapie (Gennari et al., 2004). Ce modèle est également soutenu par des

études précliniques soulignant la liaison du Trastuzumab au récepteur Fc- γ des cellules tueuses naturelles (NK), induisant ainsi la lyse des cellules associées au Trastuzumab par les cellules NK et la régression tumorale *in vivo*, tandis que des animaux traités par une molécule reconnaissant le même épitope mais sans aucun site de liaison au récepteur Fc- γ présentent une inhibition de la croissance tumorale significativement moindre (Clynes et al., 2000; Cooley et al., 1999; Lazar et al., 2006; Lewis et al., 1993). Il a de plus été montré que la liaison du Trastuzumab à HER2 entraîne l'internalisation et la dégradation du complexe, permettant ainsi de réduire les niveaux membranaires de HER2. Cette internalisation induit également la production et présentation d'épitopes de HER2, qui via le système immunitaire adaptatif peuvent activer la lyse des cellules tumorales par les lymphocytes T circulants (Hurwitz et al., 1995; Klapper et al., 2000).

Il a aussi été rapporté que la liaison du Trastuzumab à HER2 permet l'inhibition du clivage protéolytique de ce dernier, responsable de la formation du variant constitutivement actif p95m, suggérant que ce processus participe également aux effets thérapeutiques de cet agent (Molina et al., 2001). Il a d'ailleurs été montré dans un essai clinique de phase II que les variations des niveaux sériques de p95m de patients atteints de cancer du sein HER2+ corrèlent avec la réponse clinique au Trastuzumab (Esteva et al., 2002).

De plus, la surexpression de HER2 dans le cancer du sein (et du poumon) induit l'augmentation de l'expression de facteurs pro-angiogéniques tels que le VEGF ou le TGF α (Yen et al., 2002). Dans des modèles de xénogreffes, il a été montré que le Trastuzumab inhibe l'expression de certains de ces facteurs pro-angiogéniques induits par HER2, provoquant ainsi la régression de la vascularisation tumorale (Izumi et al., 2002). Toujours dans des modèles de xénogreffes, il a par ailleurs été mis en évidence que le Trastuzumab sensibilise les cellules tumorales à certains agents chimiothérapeutiques comme le cisplatine, en inhibant la réparation des dommages à l'ADN et la synthèse d'ADN, toutes deux régulées par HER2 (Pietras et al., 1994, 1998).

Au niveau cellulaire, l'inhibition de HER2 par le Trastuzumab induit l'inhibition des voies MAPK/ERK et PI3K/AKT, notamment via l'activation de PTEN (Asanuma et al., 2005; Le et al., 2005; Nagata et al., 2004; Yakes et al., 2002). En effet, il a été décrit que le Trastuzumab, en inhibant la kinase SRC, augmente l'activité de PTEN. Cette phosphatase participe alors à la régulation négative de PI3K/AKT, et la perte de son expression chez les

patientes atteintes de cancer du sein HER2+ est un marqueur prédictif de résistance au Trastuzumab (Nagata et al., 2004). Il a également été suggéré que cet agent conduit au rétablissement de l'expression de l'inhibiteur de CDK, CDKN1B (ou p27^{KIP1}) qui est diminuée par HER2 (Le et al., 2003, 2005). Au niveau cellulaire, cet agent thérapeutique induit donc l'apoptose et le blocage du cycle cellulaire.

Malgré le bénéfice de ces traitements pour la survie des patientes, de nombreux cas de résistances initiales (primaires) et acquises (secondaires) sont observés en clinique. De nombreux mécanismes de résistances ont été maintenant décrits, en vue de proposer de nouveaux outils thérapeutiques et d'améliorer la prédiction de la réponse des patientes à ces agents (outils prédictifs). Parmi ces derniers, l'activation de voies de signalisation en aval de HER2, par des mutations activatrices de la sous-unité catalytique de la PI3K ont été décrites *in vitro* et *in vivo* comme causes de résistances primaires ou secondaires au Trastuzumab (Rexer et al., 2011; Saal et al., 2005). La perte d'expression de PTEN a également été observée dans des cas de résistance en clinique (Dave et al., 2011). Le masquage de l'épitope reconnu par les agents ciblés peut également participer à la résistance, via l'augmentation de l'expression de protéines membranaires telles que MUC4 ou CD44, ou encore via l'augmentation de l'expression de variants de HER2 (discutés dans la section 1.3.4) (Bourguignon et al., 1997; Castiglioni et al., 2006; Chandarlapaty et al., 2009; Ghatak et al., 2002; Nagy et al., 2005; Pályi-Krekk et al., 2007; Price-Schiavi et al., 2002; Scaltriti et al., 2007). Enfin, l'altération des fonctions ADCC du Trastuzumab a été proposée comme mécanisme de résistance, bien que cette possibilité reste débattue (Chung et al., 2013).

Le Lapatinib est un inhibiteur de l'activité kinase des récepteurs EGFR et HER2 (Higa and Abraham, 2007). Il est utilisé en clinique en combinaison avec le Trastuzumab, ou chez des patientes atteintes de cancers du sein HER2+ métastatiques résistants au Trastuzumab (Higa and Abraham, 2007). Il a été suggéré par des essais cliniques de taille réduite que son utilisation permette en effet d'augmenter l'efficacité thérapeutique du Trastuzumab lorsque ces derniers sont administrés en combinaison, et de ralentir la progression tumorale chez des patientes métastatiques résistantes au Trastuzumab (Higa and Abraham, 2007). Cependant, deux études récentes ainsi que l'essai clinique NeoALTTO, réalisées sur des cohortes plus importantes, concluent que la Lapatinib ne présente pas de bénéfice thérapeutique lorsqu'il est administré seul (Azambuja et al., 2014; Chen et al., 2016; Mounsey et al., 2017).

Plus récemment, de nouveaux agents thérapeutiques ciblés tels que le Pertuzumab ou le Trastuzumab-Emtansine ont été approuvés (Baselga et al., 2010, 2012; Krop et al., 2012; Verma et al., 2012). Le Pertuzumab inhibe la dimérisation de HER2 avec HER3, et conduit de ce fait à une inhibition plus importante de la voie PI3K/AKT, fortement dépendante du recrutement de la sous-unité régulatrice PIK3R1 par HER3 (Lee-Hoeflich et al., 2008). Le Trastuzumab-Emtansine est constitué d'une molécule d'anticorps dirigée contre HER2 couplée à un agent cytotoxique (Pegram et al., 1999). Bien que ces agents présentent un bénéfice pour les patientes en phase clinique, les phénomènes de résistance restent prépondérants et soulignent la nécessité de développer de nouveaux outils thérapeutiques et prédictifs (Baselga et al., 2010; Chung et al., 2013; Krop et al., 2012).

Les phénomènes de résistance dans le contexte de l'inhibition de HER2 ont conduit les experts à développer des thérapies combinées (Azambuja et al., 2014; Chen et al., 2016; Mounsey et al., 2017). Le développement de nouveaux agents inhibiteurs à combiner avec les inhibiteurs de HER2 nécessite de bien caractériser les fonctions des protéines soutenant sa signalisation pro-tumorale, telles que GRB2 (Dankort et al., 2001; Giubellino et al., 2008).

1.3.7. Rôle de GRB2 dans le cancer du sein HER2+

De nombreux mécanismes requis au développement embryonnaire se sont révélés être impliqués dans la tumorigenèse, à l'instar de la transition épithélio-mésenchymateuse par exemple. Bien que sa surexpression n'indue pas la transformation de cellules *in vitro*, à l'inverse des protéines adaptatrices à domaines SH2/S3 CRK et NCK1/2, des études ont suggéré très tôt que la protéine adaptatrice GRB2 soit impliquée dans la progression tumorale du cancer du sein (Chou et al., 1992; Mayer et al., 1988). La première étude ayant démontré le rôle de GRB2 dans le développement embryonnaire chez les mammifères a également mis en évidence son implication dans l'oncogenèse mammaire. En effet, dans le modèle de cancer du sein PyMT, les souris *Grb2^{+/−}* développent des tumeurs mammaires de taille plus réduite que des souris *Grb2^{+/+}*, et l'apparition des tumeurs est retardée chez les individus mutants hétérozygotes (Cheng et al., 1998). De par son importance dans la transduction du signal en aval de nombreux RTK, la petite protéine adaptatrice GRB2 est effectivement au cœur de la

régulation de processus cellulaires qui sont dérégulés lors de la progression tumorale, en plus d'être primordiale à la transduction du signal en aval de HER2.

1.3.7.1. Fonctions de GRB2 dans l'oncogenèse

GRB2 est impliquée dans la prolifération cellulaire, tel que décrit par de nombreux travaux depuis la découverte de cette protéine adaptatrice. Il a notamment été montré que cette dernière est nécessaire à la prolifération cellulaire accrue de certaines lignées cancéreuses, puisque l'inhibition de ses fonctions signalétiques ou sa déplétion protéique réduit la prolifération cellulaire et la croissance tumorale *in vitro* et dans des modèles animaux (Iwata et al., 2013; Tanaka et al., 2012). La protéine adaptatrice GRB2 participe également au contrôle de l'adhésion cellulaire, notamment via son interaction avec FAK et les intégrines, dont la dérégulation constitue un des événements initiaux du processus métastatique. Il a d'ailleurs été montré que l'inhibition de GRB2 diminue la formation de métastases *in vivo* (Giubellino et al., 2007). Cette protéine adaptatrice participe effectivement à la transduction du signal en aval des intégrines liées à leurs ligands naturels, constituants de la matrice extracellulaire, tels que la fibronectine ou le collagène. Cette fonction de GRB2 est assurée en partie par l'interaction de cette dernière avec un complexe constitué de SRC et FAK activées par la liaison d'intégrines à leurs ligands, permettant ainsi le recrutement de SOS à la membrane et de ce fait l'activation de la voie RAS/MAPK (Barcus et al., 2013; Cheng et al., 2014; Schlaepfer et al., 1994, 1997).

Dans le contexte du cancer du sein, ceci est tout particulièrement important, puisque des changements de la rigidité de la matrice extracellulaire, telles que la plaque desmoplastique, accompagne la progression tumorale (Bochet et al., 2013). Il a d'ailleurs été montré dans des modèles de culture cellulaire 3D en collagène que la densité des gels de collagène influence le recrutement de GRB2 dans les complexes intégrines $\beta 1$ -FAK-SRC (Barcus et al., 2013). Cette étude a également mis en évidence que la formation de ces complexes protéiques au sein de cellules cancéreuses mammaires évoluant dans des gels de collagène de haute densité intervertit l'activation physiologique de STAT5 par la PRL, au profit de l'activation protumorelle de la voie RAS/MAPK via GRB2 (Barcus et al., 2013). La suractivation de la voie RAS/ERK participe à la prolifération cellulaire soutenue requise à la tumorigénèse, mais

également à l'augmentation de la sécrétion et/ou de l'activation de protéases telles que les métalloprotéases matricielles MMP ou les désintégrines et métalloprotéases ADAM, soutenant ainsi la dégradation de la membrane basale et l'invasion des tissus environnants par les cellules cancéreuses (Ding et al., 2016). De plus, par ses interactions avec de nombreuses protéines de régulation du cytosquelette telles que WASP et ARP2/3, GRB2 est impliquée dans le contrôle de la motilité et la migration cellulaires (She et al., 1997; Weisswange et al., 2009). Ainsi, des inhibiteurs de GRB2, ainsi que sa déplétion, diminuent les capacités migratoires, invasives et le potentiel métastatique de différentes cellules cancéreuses *in vitro* ainsi que dans des modèles animaux, soulignant ainsi le rôle central de GRB2 dans la signalisation pro-tumorale (Giubellino et al., 2008; Morlacchi et al., 2014).

Un rôle de GRB2 dans l'angiogenèse tumorale a également été proposé par une étude démontrant que l'inhibition de GRB2 conduit à des défauts de vasculogenèse et de tubulogenèse *in vivo* (Soriano et al., 2004).

GRB2 est ainsi au cœur de la régulation de la majorité des événements requis à la progression tumorale, et plus particulièrement à ceux requis par le processus métastatique. Étant donné l'implication majeure des métastases dans la mortalité par cancer, l'inhibition de GRB2 a été l'objet de beaucoup d'attention dans la recherche appliquée (Morlacchi et al., 2014). Des inhibiteurs des fonctions signalétiques de GRB2 très spécifiques ont ainsi été développés, la plupart agissant par compétition avec les RTK pour le domaine SH2 de la protéine adaptatrice. Ce type d'inhibiteur permet de réduire la prolifération de cellules tumorales mammaires *in vitro*, ainsi que la croissance tumorale *in vivo* (Iwata et al., 2013; Tanaka et al., 2012). Cependant, le développement de ces inhibiteurs semble avoir été abandonné. Compte-tenu du rôle primordial de GRB2 dans la transduction du signal en aval des RTK, et de son implication dans de nombreux processus cellulaires fondamentaux, il est fort envisageable que son inhibition entraîne des effets secondaires importants, et la fenêtre thérapeutique très réduite offerte par ces inhibiteurs est probablement à l'origine de leur abandon en phase pré-clinique.

1.3.7.2. Promotion de la signalisation pro-tumorale de HER2 par GRB2

Outre son implication dans la régulation des processus cellulaires pro-tumoraux évoqués ci-dessus, GRB2 est également l'un des acteurs proximaux majeurs de la signalisation par HER2, et participe de ce fait à la progression tumorale induite par ce récepteur. En effet, HER2 présente 5 sites de phosphorylation dans sa partie cytoplasmique nécessaires à la régulation de la transduction du signal en aval, ainsi qu'à ses propriétés oncogéniques (Dankort et al., 2001, 1997). La mutation de ces 5 résidus tyrosines pour des phénylalanines (non-phosphorylables), conduisant à l'expression d'un récepteur ErbB2 dénoté NYPD pour *NEU tYrosine Phosphorylation-Deficient*, abolit la transformation cellulaire induite par la suractivation du récepteur (Dankort et al., 1997). Deux de ces sites de phosphorylation sont responsables du recrutement direct (YB) ou indirect (YD) de GRB2, et chacun, lorsque réintroduit sur le récepteur NYPD, peut restaurer indépendamment la transformation cellulaire et l'initiation tumorale dépendante de HER2 (Dankort et al., 1997). Une autre étude a démontré que l'expression d'un mutant de GRB2 manquant le domaine nSH3, incapable de lier SOS et PI3KR1, inhibe la transformation cellulaire dépendante de ErbB2 (Xie et al., 1995). À l'inverse, un mutant de GRB2 sans domaine cSH3, incapable d'interagir avec SHC1 démontre un effet inhibiteur sur l'oncogénérité de ErbB2 bien plus faible (Xie et al., 1995).

Ces travaux soulignent ainsi le rôle central de GRB2 et de sa fonction d'adaptateur dans la signalisation pro-tumorale de HER2 (Xie et al., 1995). Différentes études ont d'ailleurs mis en évidence une surexpression de GRB2 dans différents cancers, dont le cancer du sein (Verbeek et al., 1997; Yu et al., 2009). Dans le modèle de cancer du sein murin PyMT, qui induit une surexpression du récepteur HER2, la délétion d'un allèle de *Grb2* a montré une diminution drastique du nombre de tumeurs mammaires formées et un retard important dans la formation de ces dernières, suggérant que bien que la surexpression de GRB2 n'indue pas de transformation cellulaire en elle-même, les niveaux d'expression de GRB2 peuvent être limitants pour la progression tumorale mammaire (Cheng et al., 1998; Lin et al., 2003). Ces travaux suggèrent un rôle essentiel de GRB2 dans l'établissement de tumeurs primaires HER2+, puisque la signalisation oncogénique dépendante de ce récepteur dépend largement de la fonction de la protéine adaptatrice.

La protéine adaptatrice GRB2 est également impliquée dans d'autres étapes de la progression tumorale HER2+, telles que le processus métastatique et la résistance aux thérapies ciblées. En effet, la transition épithélio-mésenchymateuse constitue l'une des étapes clés du processus métastatique. Dans le cas du cancer du sein, le TGF β joue un rôle primordial dans cette transition, en agissant sur son récepteur T β BR-II exprimé par les cellules épithéliales mammaires. Le recrutement et la phosphorylation de protéines SMAD2 et SMAD3 par ce récepteur activé permet la régulation négative de la prolifération de cellules épithéliales mammaires normales (Silberstein and Daniel, 1987). Cependant, il a été montré que dans des cellules mammaires cancéreuses, l'activation de ce récepteur par le TGF β mène à sa phosphorylation sur sa tyrosine Y284 par SRC, créant de ce fait un site de liaison pour GRB2 (Galliher and Schiemann, 2007; Galliher-Beckley and Schiemann, 2008). Cette interaction, qui conduit à l'activation de la voie MAPK, est requise pour l'induction de la transition épithélio-mésenchymateuse par le TGF β , et promeut la formation de métastases *in vivo* (Galliher and Schiemann, 2007; Galliher-Beckley and Schiemann, 2008). D'autres travaux ont quant à eux démontré que la surexpression de HER2 et le recrutement de GRB2 via SHC1 sont nécessaires à l'acquisition par des cellules mammaires de caractéristiques mésenchymateuses sous l'action du TGF β , soulignant encore une fois la coopération de GRB2 dans la signalisation pro-tumorale HER2+ (Northey et al., 2013). Il a par ailleurs été montré que l'interaction de HER2 constitutivement actif avec GRB2 est suffisante à l'établissement de tumeurs mammaires chez la souris, et promeut la formation de métastases aux poumons (Dankort et al., 2001).

D'autre part, une étude a montré que HER2 interagit avec le récepteur au hyaluronane CD44, exprimé par les cellules souches cancéreuses dans certains cas de cancers mammaires ou ovariens (Ajani et al., 2015; Bourguignon et al., 1997; Ghatak et al., 2002). L'interaction avec CD44 mène à l'activation du domaine kinase de HER2 dans ce contexte. De plus, cette liaison induit la formation d'un complexe signalétique incluant CD44, VAV2, HER2 et GRB2 qui conduit à l'activation de RAC1 et de RAS, augmentant ainsi la croissance et la migration de cellules tumorales ovariennes surexprimant HER2 (Bourguignon et al., 2001). D'autres travaux ont démontré le rôle de ce même récepteur CD44 dans l'endocytose de HER2 induite par sa liaison au Trastuzumab ainsi que dans des mécanismes de résistance à

cet agent thérapeutique dans le cancer du sein, suggérant un rôle potentiel de GRB2 dans la réponse et la résistance aux thérapies ciblées de HER2 (Pályi-Krekk et al., 2007).

La protéine adaptatrice GRB2 présente ainsi un rôle fondamental au maintien de l'homéostasie, mais également à la signalisation pro-tumorale, notamment dans le cancer du sein HER2+. Cependant, tel que décrit dans la section 1.3.7.1, l'inhibition de GRB2 ne constitue pas une stratégie thérapeutique applicable en clinique (Giubellino et al., 2007; Iwata et al., 2013; Morlacchi et al., 2014; Tanaka et al., 2012). Afin d'empêcher l'action pro-tumorale de GRB2 dans le cancer du sein HER2+, il est donc nécessaire de caractériser ses interacteurs, notamment ceux impliqués dans la formation de tumeurs primaires et dans le processus métastatique.

1.4. La glycoprotéine membranaire MPZL1, nouvel acteur signalétique dans la glande mammaire

MPZL1 est une glycoprotéine membranaire dont le rôle signalétique est peu caractérisé. Dans les dernières années, différentes études lui ont attribué une implication dans la progression tumorale, notamment dans l'établissement de métastases et dans la résistance au Trastuzumab dans le cancer du sein HER2+ (Jia et al., 2014; Lapin et al., 2014).

1.4.1. Structure de MPZL1

MPZL1 ou *Myelin Protein Zero-Like protein 1*, encore appelée PZR pour *Protein Zero-Related*, est une glycoprotéine membranaire de type I présentant un domaine transmembranaire unique (Fig. 1.11). Son domaine extracellulaire est constitué d'un peptide signal assurant sa localisation, ainsi que d'un domaine « *immunoglobuline-like* » comprenant deux résidus cystéine, présentant 99.1% d'identité avec le domaine variable des immunoglobulines (IgV) (Roubelakis et al., 2007; Zhao and Zhao, 1998). Cette portion extracellulaire présente deux sites potentiels de N-glycosylation chez l'humain, et trois chez la souris. Par la suite il a été démontré que MPZL1 est effectivement N-glycosylée (Roubelakis et al., 2007; Zhao and Zhao, 1998). Il a d'ailleurs été suggéré que cette

glycosylation soit régulée de manière tissu-spécifique en raison de la variation du profil de migration sur gel de MPZL1 extraite de différentes lignées cellulaires (Kusano et al., 2008).

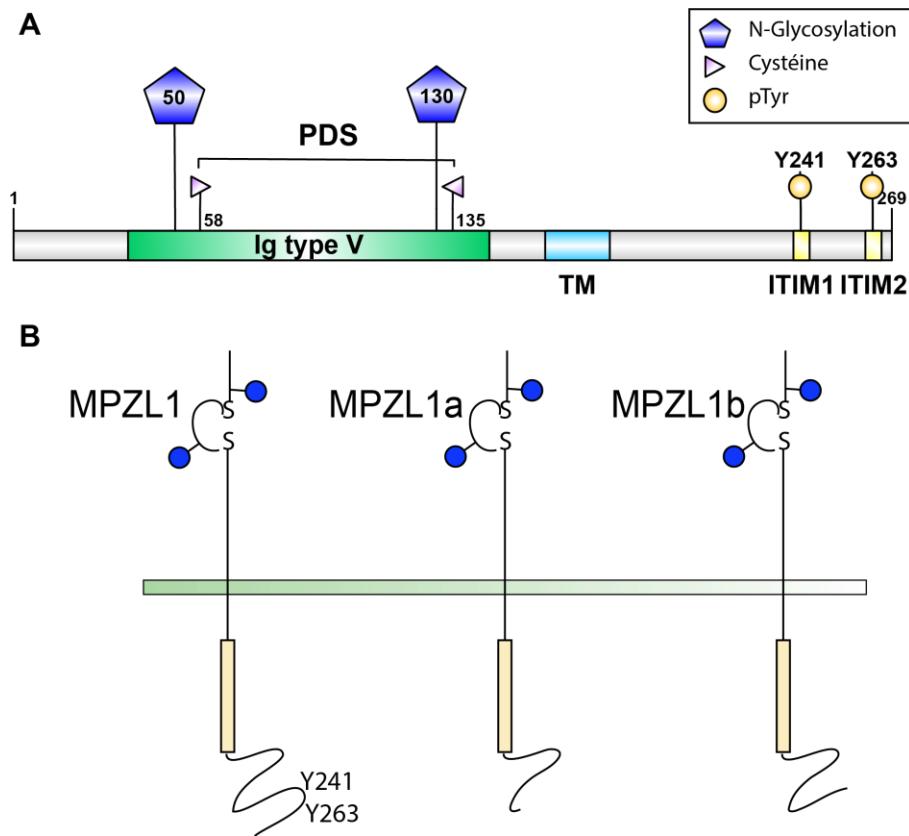


Figure 1.11 : Structure de la protéine MPZL1 et de ses isoformes.

A- La protéine MPZL1 présente un domaine de type immunoglobuline V dans sa partie extracellulaire arborant 2 sites de N-glycosylation, Asn50 et Asn130, représentés par un losange bleu. Ce domaine inclue également deux cystéines (triangles gris) engageant un pont disulfure, noté PDS. La région transmembranaire de MPZL1 est constituée d'une unique hélice α . La partie intracellulaire de MPZL1 présente deux motifs ITIM incluant les tyrosines Y241 et Y263, représentées par un rond jaune. B- L'isoforme principal de MPZL1 présente 2 sites de glycosylation (ronds bleus), 2 cystéines (S) impliquées dans un pont disulfure, et deux tyrosines ancrées dans des motifs ITIM (Y241 et Y263). Les 2 isoformes alternatifs de MPZL1 identifiés, MPZL1a et MPZL1b présentent une queue cytoplasmique tronquée, et n'arborent pas de motif ITIM.

Le domaine extracellulaire de MPZL1 partage 45.8% d'identité et 60.2% de similarité de séquence protéique avec la myéline P0, une protéine impliquée dans la formation et la structure de la gaine de myéline périphérique, via des interactions homophiliques permettant de rapprocher les feuillets de membrane plasmique lors de la spiralisation des cellules de

Schwann (Lemke and Axel, 1985; Zhao and Zhao, 1998). Le domaine intracellulaire de MPZL1 contient deux motifs dits ITIM pour *Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibitory motif* (Zhao and Zhao, 1998). Ces motifs en tandem, de séquence consensus {I/L/V}-x-x-Y-x-{L/V}, ont été décrits initialement dans la séquence de récepteurs de l'immunité tels que FC γ RIIB (Daëron et al., 2008; Muta et al., 1994). La liaison de ces récepteurs immunitaires à leur ligand induit la phosphorylation des résidus tyrosine au sein des ITIM par des kinases de la famille SRC. Ceci permet le recrutement et l'activation de phosphatases telles que PTPN6 et PTPN11 via les domaines SH2 en tandem de ces dernières. La présence de deux motifs ITIM en tandem permet d'augmenter la spécificité d'interaction avec des protéines présentant deux domaines en tandem de liaison à des résidus pY tels que les deux domaines SH2 des phosphatases PTPN6 et 11 (Ottinger et al., 1998). Les phosphatases ainsi activées permettent la déphosphorylation de nombreuses protéines, et présentent ainsi un rôle général d'inhibition de la signalisation, notamment dans la régulation de la réponse immunitaire (Daëron et al., 2008).

MPZL1 est conservée du poisson zèbre, *Danio rerio*, à l'humain. Chez le poisson zèbre, la souris et l'humain, son expression est ubiquitaire, et elle est détectée dans des stades précoce du développement dans différents modèles animaux (Paardekooper Overman et al., 2014; Roubelakis et al., 2007; Zhao and Zhao, 2003). D'autre part, deux isoformes alternatif de MPZL1, dénommés MPZL1a et MPZL1b, ont été mis en évidence chez l'humain, et l'isoforme MPZL1b a également été détecté chez la souris (figure 1.11B). L'isoforme MPZL1a n'a été détecté qu'au niveau de son ARNm, tandis que la forme protéique de l'isoforme MPZL1b a été confirmée dans des cellules humaines (Zhao and Zhao, 2003). Ces deux derniers, issus d'épissage alternatif, présentent une séquence tronquée et différent de l'isoforme principal uniquement par leur partie intracellulaire qui ne contient pas les ITIM (Fig. 1.11) (Roubelakis et al., 2007; Zannettino et al., 2003; Zhao and Zhao, 2003). L'expression de l'isoforme MPZL1b est ubiquitaire, tout comme l'isoforme principal. Cependant l'expression relative des deux isoformes varie en fonction du tissu et du type cellulaire chez l'humain (Zannettino et al., 2003; Zhao and Zhao, 2003).

1.4.2. Fonctions signalétiques connues de MPZL1

Caractérisée pour la première fois à la fin des années 1990, MPZL1 a été suggérée détenir un rôle important dans la signalisation cellulaire en tant qu'interacteur et potentiel substrat de PTPN11 (Zhao and Zhao, 1998; Zhao et al., 1995). Une série de publications du laboratoire du Dr Zhao a permis de caractériser les déterminants moléculaires de l'association de cette glycoprotéine à la tyrosine phosphatase PTPN11, ainsi que la stimulation de la signalisation dépendante de MPZL1 par son association avec des facteurs extracellulaires tels que la lectine végétale concanavaline A (Zhao and Zhao, 2000, 2003, 1998, Zhao et al., 2002, 1995). Il a ainsi été décrit que MPZL1 interagit avec la kinase SRC de façon constitutive (Zhao et al., 2002). Lors de l'association de MPZL1 à certains constituants extracellulaires ou potentiels ligands, la kinase SRC associée à la glycoprotéine est activée par phosphorylation, par un mécanisme encore inconnu à ce jour. La kinase SRC ainsi activée est responsable de la phosphorylation des résidus Y241 et Y263 inclus dans les ITIM de MPZL1, permettant ainsi le recrutement de PTPN11 à la membrane (Fig. 1.12) (Zhao and Zhao, 2000; Zhao et al., 2002). Contrairement à la plupart des ITIM décrits dans la littérature qui peuvent interagir avec PTPN6 ou PTPN11 indifféremment, ceux de MPZL1 lient les domaines SH2 de PTPN11 de façon très spécifique et n'interagissent pas avec PTPN6 (Zhao and Zhao, 1998).

L'interaction de PTPN11 avec MPZL1 permet le relâchement de l'auto-inhibition de son activité phosphatase assurée par les contacts établis entre son premier domaine SH2 et le domaine catalytique (Hof et al., 1998; Zhao et al., 2003). La fonction des phosphatases dans la signalisation est souvent considérée restreinte à leur rôle de régulateur négatif, par déphosphorylation inactivatrice des acteurs de voies de signalisation en aval des récepteurs aux facteurs de croissance, par exemple. Cependant, la phosphatase PTPN11 a été démontrée comme ayant un rôle positif dans la signalisation, essentiel à différents processus (Perrimon et al., 1995). Cette phosphatase est ainsi requise à l'activation soutenue de la voie RAS/MAPK en aval de certains RTK (Araki et al., 2003; Cunnick et al., 2002; Holgado-Madruga et al., 1996). L'association de MPZL1 à la concanavaline A, qui induit sa phosphorylation ainsi que le recrutement et l'activation de PTPN11 conduit notamment à des changements morphologiques cellulaires importants. Il a donc été proposé dans ces études

que PTPN11 puisse présenter ici un rôle positif de transduction du signal en aval de MPZL1 (Zhao et al., 2002).

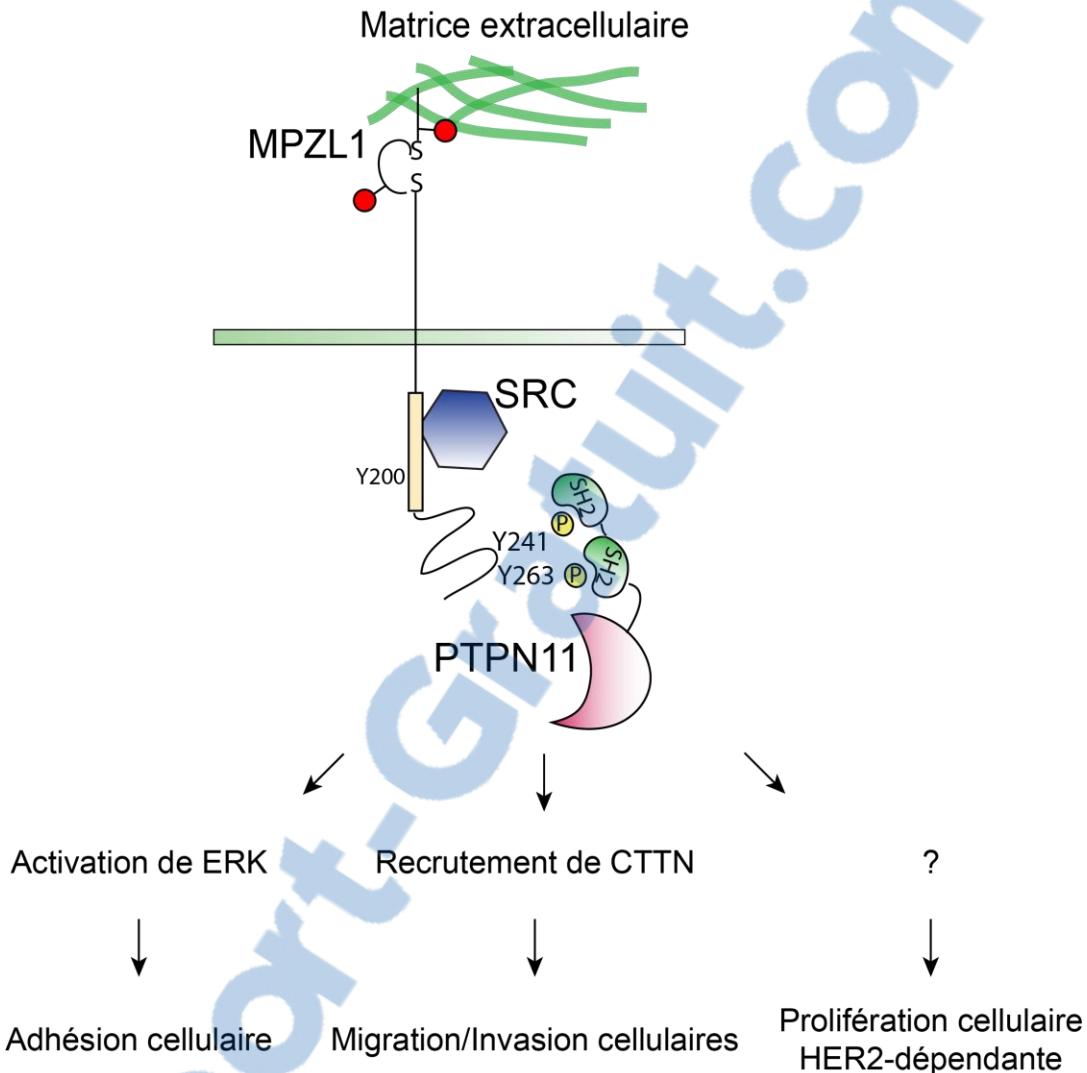


Figure 1.12 : Interactions et fonctions cellulaires connues de MPZL1

La protéine MPZL1 est constitutivement associée à la kinase SRC. Lors de l'adhésion cellulaire sur certains constituants de la matrice extracellulaire tels que la fibronectine, la kinase SRC alors activée phosphoryle les résidus Y241 et Y263 de MPZL1, qui appartiennent à des motifs ITIM. Ces derniers permettent le recrutement membranaire de la phosphatase PTPN11 et ainsi son activation. Le complexe MPZL1-PTPN11 a été impliqué dans différentes fonctions cellulaires, dont la migration, l'adhésion et la prolifération.

Il a par la suite été suggéré que MPZL1 soit impliquée dans la reconnaissance du microenvironnement (matrice extracellulaire et cellules avoisinantes), ainsi que dans le contrôle de fonctions cellulaires dépendantes de cette reconnaissance, telles que l'adhésion,

la migration et la prolifération cellulaire. En effet, MPZL1 est hyperphosphorylée lors de l’adhésion cellulaire à des protéines extracellulaires telles que la fibronectine, et cette phosphorylation est inhibée par PP1, un inhibiteur des kinases de la famille SRC (Eminaga and Bennett, 2008; Zhao et al., 2002). Par la suite, il a été démontré que la surexpression de MPZL1 conduit, de façon dépendante de l’activation de PTPN11, à une augmentation de la motilité cellulaire sur fibronectine de fibroblastes embryonnaires murins (Zannettino et al., 2003). D’autre part, une étude a démontré un rôle de MPZL1, dépendant encore une fois de PTPN11, dans l’activation de ERK médiée par l’adhésion cellulaire sur fibronectine (Eminaga and Bennett, 2008). Une étude récente a de plus montré que MPZL1 facilite la migration et l’invasion de cellules d’hépatome, via la phosphorylation et l’activation de SRC et de la cortactine (CTTN) (Jia et al., 2014). Une autre étude a quant à elle démontré que la surexpression de MPZL1 augmente la migration cellulaire sur fibronectine, alors que cette surexpression n’influence pas la migration sur collagène de type IV, gélatine, laminines, ou bien en absence de substrat, suggérant ainsi que ces composants n’induisent pas de signalisation dépendante de MPZL1 (Roubelakis et al., 2007). Un rôle de MPZL1 dans la migration cellulaire sur fibronectine a également été mis en évidence dans le contexte d’infections virales par une étude qui a caractérisé cette glycoprotéine comme interacteur de certaines protéines virales (Martinez-Martin et al., 2016).

Cependant, il semblerait que l’effet de MPZL1 dans ces processus soit très dépendant du modèle expérimental, et potentiellement du type cellulaire et tissulaire (Kusano et al., 2008). En effet, une étude a démontré que la motilité de cellules endothéliales sur fibronectine n’était pas affectée par la déplétion de MPZL1 (Kusano et al., 2008). Ces résultats, suggèrent que les fonctions de la glycoprotéine dans la migration cellulaire sur fibronectine dépendent donc du type cellulaire (Jia et al., 2014, Roubelakis et al., 2007, Zannettino et al., 2003). Par ailleurs, il a été démontré que seule la protéine pleine longueur facilitait la migration de cellules sanguines sur fibronectine, contrairement aux isoformes MPZL1a et b, qui agiraient comme des dominants négatifs (Zannettino et al., 2003). Étant donné que l’expression relative de l’isoforme principal et MPZL1b est régulée au niveau tissulaire, ce phénomène a été proposé comme un mécanisme de régulation de la signalisation de MPZL1 (Zhao and Zhao, 2003). La signalisation induite par MPZL1 dépendrait ainsi du niveau relatif de ces isoformes, et donc serait très fortement dépendante du modèle cellulaire utilisé.

Enfin, il a été montré que MPZL1 et sa phosphorylation sont requises à la gastrulation chez le poisson zèbre (Paardekooper Overman et al., 2014). Cette étude, ainsi que d'autres travaux, ont mis en évidence le rôle primordial de MPZL1 dans le recrutement membranaire de PTPN11, requis pour l'activation de cette dernière, notamment à cette étape du développement. Ces travaux ont de plus souligné l'implication de MPZL1 dans les syndromes développementaux de Noonan et LEOPARD, causés par mutations activatrices de PTPN11 (Eminaga and Bennett, 2008; Paardekooper Overman et al., 2014).

1.4.3. Implication de MPZL1 dans la progression tumorale

La reconnaissance du microenvironnement et l'adaptation cellulaire à ce dernier au niveau des fonctions de prolifération, d'adhésion, de migration et d'invasion sont absolument nécessaires à l'homéostasie cellulaire et tissulaire. La modification du microenvironnement et de sa perception par les cellules tumorales constitue ainsi une des caractéristiques primordiales de la progression tumorale (Hanahan and Weinberg, 2011). Un intérêt grandissant a ainsi été apporté aux glycoprotéines transmembranaires comme acteurs de cette reconnaissance et en tant que cibles thérapeutiques potentielles (Kufe, 2013; Price-Schiavi et al., 2002). L'implication de MPZL1 dans ces fonctions a été proposée par plusieurs études.

En effet, il a été montré que la concanavaline A, très étudiée dans les années 70 pour son action tumoricide *in vitro* et *in vivo*, se lie au domaine extracellulaire de MPZL1 et induit la phosphorylation de cette dernière (section 1.4.2) (Burger and Noonan, 1970; Zhao et al., 2002). De plus, cette étude a démontré que l'adhésion et les changements morphologiques cellulaires médiés par la concanavaline A dépendent du niveau d'expression de MPZL1, ainsi que de la formation d'agrégats de MPZL1 ayant un domaine intracellulaire fonctionnel (Zhao et al., 2002). MPZL1 a donc été mis en évidence comme un acteur majeur de la signalisation induite par la concanavaline A, et proposé comme intermédiaire de l'action tumoricide de cette dernière (Zhao et al., 2002).

Plus récemment, une étude a révélé que le gène *MPZL1* présentait une altération du nombre de copies dans près de 50% des cas de cancer du foie (Jia et al., 2014). Cette étude a également démontré que les niveaux d'expression de MPZL1 contrôlent les capacités migratoires et invasives des cellules d'hépatome via SRC et CTTN, ainsi que la formation de

métastases au poumon dans un modèle murin (Jia et al., 2014). Une autre étude a suggéré un rôle de MPZL1 dans la prolifération de cellules de cancer du sein et dans la résistance au Trastuzumab, inhibiteur ciblé de HER2 (Lapin et al., 2014).

MPZL1 semble ainsi être impliquée dans la reconnaissance du microenvironnement par la stimulation de ses fonctions signalétiques spécifiques à certains constituants de la matrice extracellulaire. La promotion de l'adhésion, de la migration et de la prolifération cellulaires par MPZL1 phosphorylée suggère que cette glycoprotéine puisse ainsi constituer un nouvel acteur du contrôle de l'homéostasie et de la progression tumorale.

1.5. Hypothèse et objectifs

La protéine adaptatrice GRB2, impliquée dans la transduction du signal en aval des RTK, régule donc la spécificité et la diversité des réponses cellulaires par ses interactions avec différentes combinaisons de récepteurs et d'effecteurs. La suractivation du RTK HER2 dans 15-20% des cas de cancer du sein (dits HER2+) est associée à un mauvais pronostic. GRB2 interagit avec ce dernier et recrute ainsi des complexes signalétiques soutenant l'oncogenèse et la progression tumorale induites par HER2. Cette protéine adaptatrice constitue de ce fait un acteur majeur de la signalisation en aval de HER2. Nous avons donc émis l'hypothèse que les réseaux d'interactions de GRB2 sont modifiés au cours de la progression tumorale du cancer du sein HER2+, soutenant par ces modifications la signalisation pro-tumorale HER2-dépendante. L'objectif général de ma thèse était donc de caractériser les réseaux d'interactions de GRB2 au cours de la progression tumorale et l'implication fonctionnelle des interactions caractérisées dans le processus oncogénique HER2-dépendant. Mon projet de thèse est ainsi axé autour de deux objectifs, soit (1) identifier les interactions de GRB2 et leurs modifications dans des cellules de cancer du sein HER2+ (chapitre 2) ainsi que dans des modèles de progression tumorale HER2+ (chapitre 3), et (2) caractériser les déterminants moléculaires de l'association nouvellement identifiée entre MPZL1 à GRB2 (chapitre 2).

2. Chapitre 2 : MPZL1 forms a signalling complex with GRB2 adaptor and PTPN11 phosphatase in HER2-positive breast cancer cells

Alice Beigbeder^{1,2,3}, François J. M. Chartier^{1,2,3}, Nicolas Bisson^{1,2,3,4*}

¹Centre de recherche du Centre Hospitalier Universitaire (CHU) de Québec-Université Laval, Axe Oncologie, Québec, QC G1R 3S3, Canada

²Centre de recherche sur le cancer de l'Université Laval, Québec, QC G1R 3S3, Canada

³PROTEO-Quebec Network for Research on Protein Function, Engineering, and Applications, Québec, QC G1V 0A6, Canada

⁴Department of Molecular Biology, Medical Biochemistry and Pathology, Université Laval, Québec, QC G1V 0A6, Canada.

* To whom correspondence should be addressed (nick.bisson@crchudequebec.ulaval.ca)

2.1. Avant-propos

Mon projet de doctorat avait pour objectif de caractériser les réseaux de signalisation de GRB2 au cours de la progression tumorale dans le cancer du sein HER2+. Ces études ont été effectuées avec l'aide du Dr F. Chartier. Ces travaux ont permis de mettre en évidence de nouveaux interacteurs de GRB2 non recensés dans la littérature, et tous potentiellement impliqués dans la signalisation pro-tumorale via le récepteur HER2. J'ai choisi de concentrer la suite de ce projet sur la nouvelle interaction entre MPZL1 et GRB2 en raison du peu d'information disponible concernant MPZL1, et de son implication dans le processus métastatique. De plus, la caractérisation de son interaction avec PTPN11 apportait des informations précieuses pour orienter la caractérisation des déterminants moléculaires de son interaction avec GRB2. J'ai eu l'opportunité de caractériser les déterminants moléculaires de cette nouvelle interaction de GRB2 et de souligner le rôle potentiel du nouveau complexe ainsi caractérisé dans l'adhésion cellulaire. Ce projet a fait l'objet d'un article publié en septembre 2017 dans *Scientific Reports*. J'ai contribué à la totalité des figures, j'ai analysé les données avec mon collègue F. Chartier et j'ai rédigé l'article avec N. Bisson. Ma contribution à cet ouvrage est évaluée à 90%.

2.2. Résumé

GRB2 est une protéine adaptatrice impliquée dans la signalisation par les RTK. En interagissant avec une variété très large de récepteurs membranaires et d'effecteurs cytoplasmiques, GRB2 contrôle la spécificité et la diversité des réponses cellulaires. GRB2 joue un rôle crucial dans la signalisation en aval du RTK oncogénique HER2, notamment dans la régulation de la prolifération et de la transformation cellulaires. HER2 est surexprimé dans 15-20% des cancers du sein, dits HER2+, et sa surexpression est associée à un mauvais pronostic. La capacité de GRB2 à lier différentes combinaisons de récepteurs et d'effecteurs est centrale à sa fonction de régulation de la signalisation. Nous avons donc émis l'hypothèse que dans un contexte de surexpression de HER2, les réseaux d'interaction de GRB2 incluraient de nouveaux complexes signalétiques participant à la signalisation pro-tumorale de HER2. Nous avons ainsi caractérisé les partenaires de GRB2 dans des cellules humaines de cancer du sein HER2+ par des expériences de purifications d'affinités combinées à des analyses de spectrométrie de masse (AP-MS), une méthode robuste permettant l'étude de complexes signalétiques. Ces expériences ont permis d'identifier plus de 30 partenaires de GRB2, dont des interacteurs connus (e.g. PTPN11) ainsi que des partenaires non décrits dans la littérature tels que MPZL1. Cette dernière est une glycoprotéine membranaire impliquée dans la signalisation induite par certains constituants de la matrice extracellulaire. Il a précédemment été montré que MPZL1 est impliquée dans le contrôle de l'adhésion et la migration cellulaires. Nous avons démontré ici que son interaction avec GRB2 dépend du domaine SH2 (SRC Homology domain 2) de cette dernière. Nous avons également mis en évidence que la phosphatase PTPN11, connue pour interagir avec MPZL1 et GRB2, fait partie de ce complexe. Par la suite, nous avons prouvé que la phosphorylation de deux tyrosines sur MPZL1 est nécessaire à sa liaison à GRB2. Nous avons également démontré que la fibronectine, qui promeut la phosphorylation de MPZL1, induit l'association du complexe à la membrane de cellules de cancer du sein HER2+ en adhésion. Nos données suggèrent que le complexe signalétique identifié soit impliqué dans le contrôle de l'adhésion cellulaire, fonction cruciale du processus métastatique.

2.3. Abstract

HER2 is overexpressed in a significant fraction of breast tumours and is associated with a poor prognosis. The adaptor protein GRB2 interacts directly with activated HER2 and is sufficient to transmit oncogenic signals. However, the consequence of HER2 activation on global GRB2 signalling networks is poorly characterized. We performed GRB2 affinity purification combined with mass spectrometry analysis of associated proteins in a HER2+ breast cancer model to delineate GRB2-nucleated protein interaction networks. We report the identification of the transmembrane protein MPZL1 as a new GRB2-associated protein. Our data show that the PTPN11 tyrosine phosphatase acts as a scaffold to bridge the association between GRB2 and MPZL1 in a phosphotyrosine-dependent manner. We further demonstrate that the formation of this MPZL1-PTPN11-GRB2 complex is triggered by cell attachment to fibronectin. Thus, our data support the importance of this new signalling complex in the control of cell adhesion of HER2+ breast cancer cells, a key feature of the metastatic process.

2.4. Introduction

Human Epidermal Growth Factor 2 (HER2) is an oncogenic receptor tyrosine kinase (RTK) belonging to the Epidermal Growth Factor (EGF) receptor family¹. HER2 is overexpressed in 15-20% of breast cancer (BCa) patients (HER2+), and this is associated with poor prognosis². HER2 overexpression initiates transformation and is also involved in metastasis as well as chemoresistance³⁻⁵. Targeted therapies such as trastuzumab were successfully developed and have been commonly utilized in the clinic for the past two decades^{6,7}. However, only one-third of patients with HER2-positive metastatic breast tumors will respond to this treatment^{8,9}.

Several molecular mechanisms detailing the consequences of HER2 activation have been highlighted^{1,3,10,11}. For example, the adaptor protein Growth factor Receptor-Bound protein 2 (GRB2), which is overexpressed in a number of BCa cell lines, was reported to be an essential proximal mediator of HER2^{3,4}. In addition, a constitutively active HER2 (NEU-NT) mutant that is unable to bind GRB2 displayed a lower oncogenic potential, arguing for a role for GRB2 in HER2 tumor-promoting functions^{3,4}. GRB2 bears a central Src-Homology (SH) 2 domain that can bind to phosphorylated residues within the pY-Φ-N-Φ consensus motif (where Φ represents an hydrophobic residue). This domain is required for binding to RTKs or cytoplasmic Tyr phosphorylated proteins and for the transmission of signals to downstream effectors^{12,13}. The latter process involves the two SH3 domains of GRB2, present on the N- and C-terminal side of the SH2 domain, respectively. Both GRB2 SH3 domains are able to bind Pro/Arg-rich motifs in a constitutive fashion, not requiring any posttranslational modification¹⁴. GRB2 key role is thus to couple signal from activated RTKs, such as HER2, to downstream effectors such as the RAS/MAPK activator SOS. GRB2 has previously been shown to be involved in BCa progression, *in vitro* as well as in murine models in which its expression level was correlated with tumor growth¹⁵⁻¹⁷.

MPZL1 (PZR) is a glycoprotein involved in extracellular matrix-induced signal transduction^{18,19}. It was recently demonstrated that HER2+ cell proliferation as well as resistance to targeted therapies are dependent on its expression levels²⁰. MPZL1 contains a unique transmembrane domain and two intracellular Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibitory Motifs (ITIM)¹⁸. Specific extracellular proteins such as fibronectin have been shown to promote SRC Family Kinases phosphorylation of MPZL1 ITIM-embedded Tyr241 and Tyr263 residues

^{19,21,22}. This latter event is required for the recruitment and subsequent activation of the PTPN11/SHP2 Tyr phosphatase¹⁸. In addition, phosphorylated MPZL1 was previously linked to the regulation of cell adhesion and migration^{21,23,24}.

Evidences suggest that the organization of signalling networks is disrupted in cancer. In particular, phosphotyrosine (pTyr)-dependent networks are heavily modulated and even deregulated in cancer cells^{25,26}. The central role of GRB2 in HER2 signalling led us to hypothesize that the analysis of modifications within the GRB2 protein interaction network in HER2+ breast cancer cells would lead to the identification of key components required for downstream signalling. We combined GRB2 affinity purification (AP) with mass spectrometry (MS) identification of associated proteins in HER2+ breast cancer cells to delineate GRB2-nucleated protein interaction networks. We report the identification of MPZL1 as a new GRB2-associated protein. We show that MPZL1 associates with GRB2 in a pTyr-, PTPN11-dependent manner. Our data also demonstrate that the formation of MPZL1-PTPN11-GRB2 complex is regulated by cell adhesion on fibronectin.

2.5. Results

2.5.1. Protein interaction network mapping in HER2+ breast cancer cells reveals new GRB2 binding partners

To characterize GRB2 signalling complexes in HER2+ breast cancer cells, we generated HCC1954 cell lines stably expressing 3xFLAG-tagged GFP and 3xFLAG-GRB2. We confirmed that the 3xFLAG-GRB2 chimera was expressed at sub-endogenous levels to prevent adverse effects on protein complex stoichiometry, and that it displayed the same cytoplasmic localization as endogenous GRB2 (Fig. 2.1a-b). Affinity purification (AP) of 3xFLAG-GRB2 from cell lysates followed by mass spectrometry (MS) identification led to the discovery of 18 proteins in GRB2 complexes, following background subtraction with the SAINT algorithm using 3xFLAG-GFP as a control (Fig. 2.1c, Supplementary Table S1)²⁷. This list included a number of *bona fide* GRB2 SH2-dependent partners including PTPN11 and SHC1²⁸, thus confirming the presence of pTyr residues resulting from HER2 overexpression and activation in HCC1954 cells. Nonetheless, in order to obtain the full

complement of phospho-dependent interactions, we repeated experiments using sodium orthovanadate (pervanadate, PV), a phosphatase inhibitor that broadly elevates the total level of endogenous tyrosine phosphorylation. This led to the identification of another 12 GRB2-associated proteins (Fig. 2.1c, Supplementary Table S1). Among the 33 proteins that constitute the GRB2 signalling network in HER2+ cells, we discovered five candidates that were absent in the BioGRID database²⁹. Remarkably, this list comprised three proteins that were previously suggested to play a role in breast cancer progression: the Rho family GTPases activating protein ARHGEF35³⁰, the membrane-associated glycoprotein MPZL1²⁰ and the adaptor protein STAP2³¹, confirming the validity of our approach.

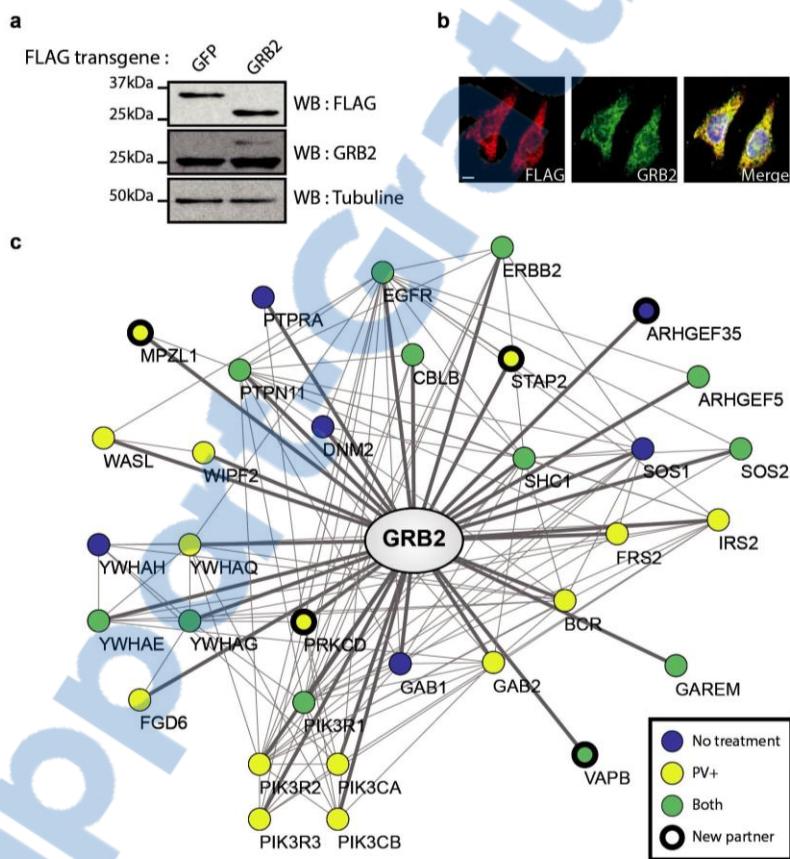


Figure 2.1. Protein interaction network mapping in HCC1954 HER2+ cells reveals new GRB2 binding partners.

(a) Clonal stable cell lines expressing either 3xFLAG-GFP (30 kDa) or 3xFLAG-GRB2 (28 kDa) fusion proteins were analyzed by Western blot to evaluate transgene expression. (b) FLAG-GRB2 cells were analyzed by immunofluorescence to verify protein localization (scale bar = 10 μ m). (c) GRB2 protein interaction network obtained by AP-MS from HCC1954 cells treated or not with a phosphatase inhibitor (PV). Proteins displaying a SAINT

score above 0.9 are represented in the network (Supplementary Table S1). Edges represent interactions obtained by AP-MS (bold) or previously reported (narrow).

2.5.2. MPZL1 associates with GRB2 in a pTyr, PTPN11-dependent manner

To confirm the association between MPZL1 and GRB2 in other cell types, we transiently transfected 3xFLAG-GRB2 or a 3xFLAG-GFP control in HEK293T cells that we used for AP followed by Western blotting for MPZL1. We validated their association in cells treated with PV (Fig. 2.2a).

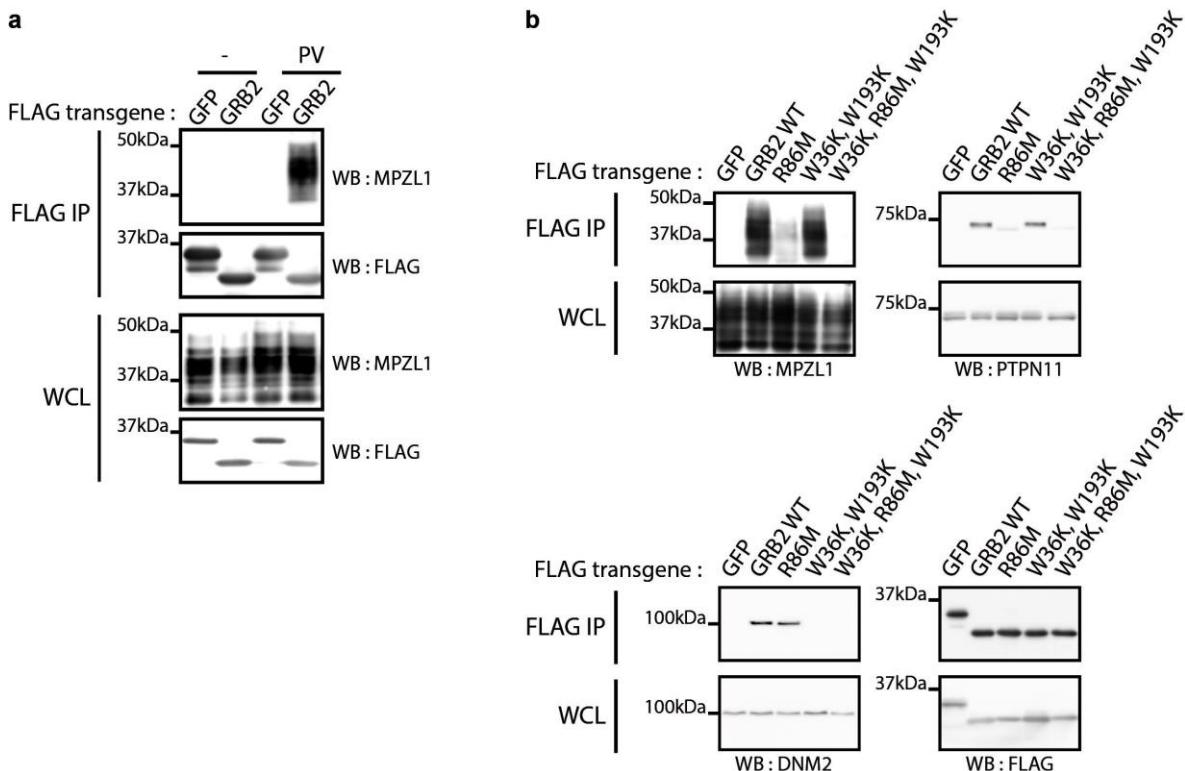


Figure 2.2. GRB2 associates with MPZL1 in a phosphotyrosine, SH2 domain-dependent manner.

(a) HEK293T were transiently transfected with FLAG-GFP or GRB2 and lysates were used to perform an AP followed by Western blot analysis. (b) HEK293T were transiently transfected with FLAG-GFP or GRB2 (WT or point mutants), treated with PV and utilized as in (a).

To further characterize the interaction, we introduced substitutions that inactivate the conventional binding of the two SH3 domains (W36K, W193K) or the SH2 domain (R86M)²⁸. Using *bona fide* GRB2 SH2 (PTPN11) and SH3 (DNM2) direct binding partners, we confirmed the specificity of the GRB2 mutants (Fig. 2.2b). We showed that the MPZL1

interaction was fully dependent on the presence of a functional SH2 domain (Fig. 2.2b). However, a survey of the MPZL1 sequence did not reveal consensus pTyr binding sites for GRB2 SH2 domain, arguing for an indirect interaction. The Tyr phosphatase PTPN11 is a well-characterized GRB2 SH2 direct binding partner (Fig. 2.2b) that was previously shown to associate with MPZL1 in a pTyr-dependent manner^{18,32}. We also identified PTPN11 in our AP-MS experiments from HCC1954 cells (Fig. 2.1c). To explore the existence of GRB2-MPZL1-PTPN11 signalling complex in intact cells, we immuno-precipitated endogenous MPZL1 and detected by Western blotting both PTPN11 and GRB2 (Fig. 2.3a).

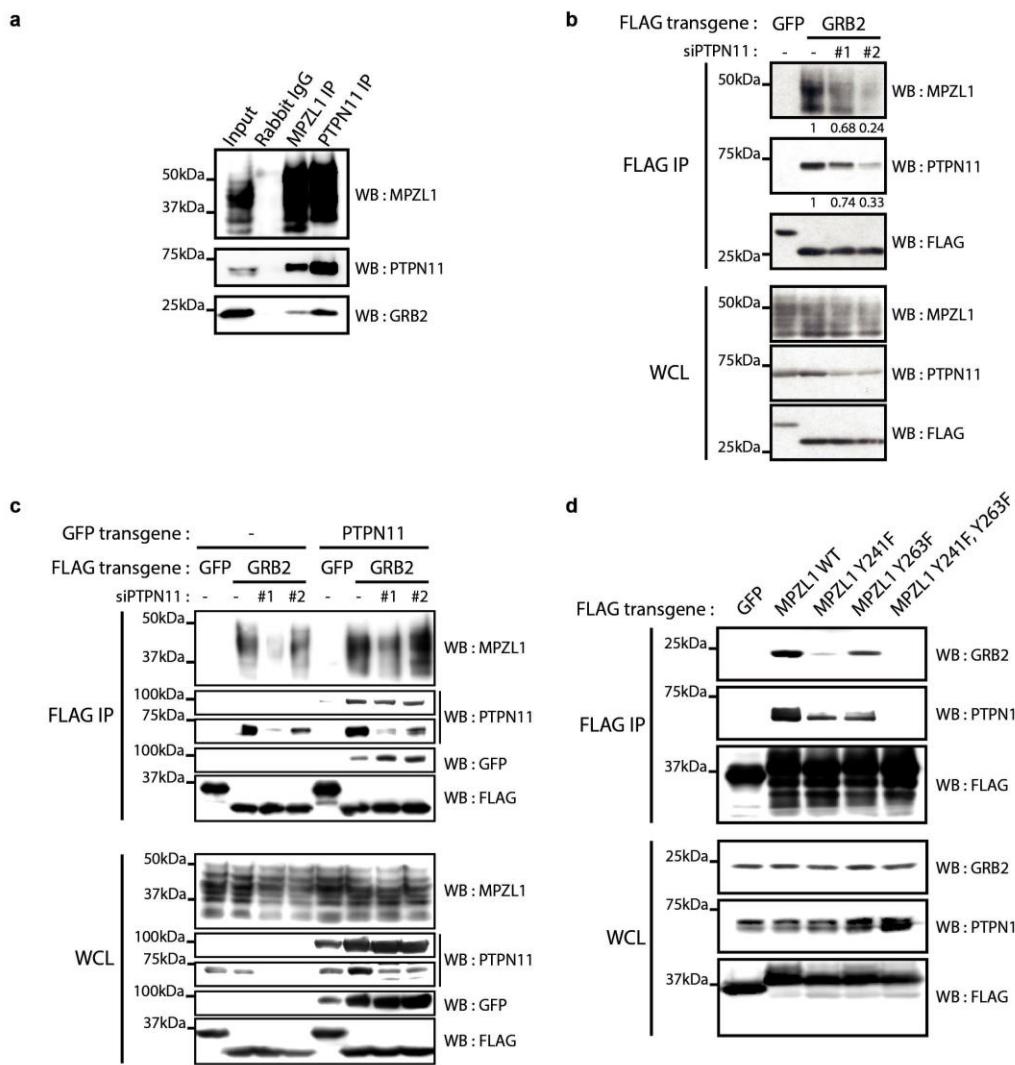


Figure 2.3. The tyrosine phosphatase PTPN11 is required as a scaffold for the GRB2/MPZL1 interaction.

(a) HEK293T were treated with PV and lysates were used to perform APs using the indicated antibodies, followed by a Western blot analysis. (b) HEK293T cells were depleted of endogenous PTPN11 using DsiRNAs and transiently transfected with FLAG-GFP or GRB2

transgenes. FLAG APs were performed on cell lysates following PV treatment and analyzed by Western blot. **(c)** Cells obtained as in **(b)** were transfected with a GFP-tagged murine PTPN11 that is DsiRNA-resistant. Cells were treated with PV and FLAG APs were performed for each condition, prior to Western blotting analysis. **(d)** HEK293T cells were transfected with FLAG-GFP, MPZL1 (WT or non-phosphorylatable Y/F point mutants), treated with PV and utilized for FLAG APs - Western blotting.

Conversely, MPZL1 and GRB2 were both present in immuno-precipitated endogenous PTPN11 complexes. These results confirmed that all three proteins were part of a pTyr-dependent protein complex. To assess the requirement of PTPN11 in the network, we examined the GRB2-MPZL1 association in cells transiently depleted of PTPN11 using DsiRNAs. We found that the presence of MPZL1 in GRB2 affinity-purified complexes was directly correlated with PTPN11 levels, suggesting that the latter is required as a scaffold for the signalling complex (Fig. 2.3b). This finding was further supported by our observation that MPZL1 levels were increased in GRB2 complexes upon expression of a GFP-PTPN11 transgene that is siRNA-resistant (Fig. 2.3c).

MPZL1 ITIMs (Tyr241 and Tyr263) were previously shown to bind both PTPN11 SH2 domains³². To determine whether the phosphorylation of these residues is required, we introduced Y241F and Y263F mutations, alone or in combination, in 3xFLAG- MPZL1. AP followed by Western blotting revealed that while PTPN11 binding was lost only for the compound MPZL1 mutant as expected, Tyr241 was mainly responsible to maintain the association with GRB2 (Fig. 2.3d). Together, our data show that MPZL1 associates with GRB2 in a complex that is dependent on tyrosine phosphorylation, using PTPN11 as a scaffold.

2.5.3. MPZL1-PTPN11-GRB2 complex formation is regulated by cell adhesion on fibronectin

The MPZL1 membrane glycoprotein was shown to be phosphorylated by SRC family Tyr kinases upon its attachment to specific extracellular matrix proteins including fibronectin^{19,23}. To explore whether MPZL1-PTPN11-GRB2 complex formation is regulated by attachment to fibronectin, we expressed 3xFLAG-GRB2 or 3xFLAG-GFP in HEK293T cells, which we seeded either on plastic or on fibronectin. We analyzed FLAG affinity -purified complexes

by Western blotting and found that both MPZL1 and PTPN11 were associated with GRB2 following fibronectin attachment (Fig. 2.4a).

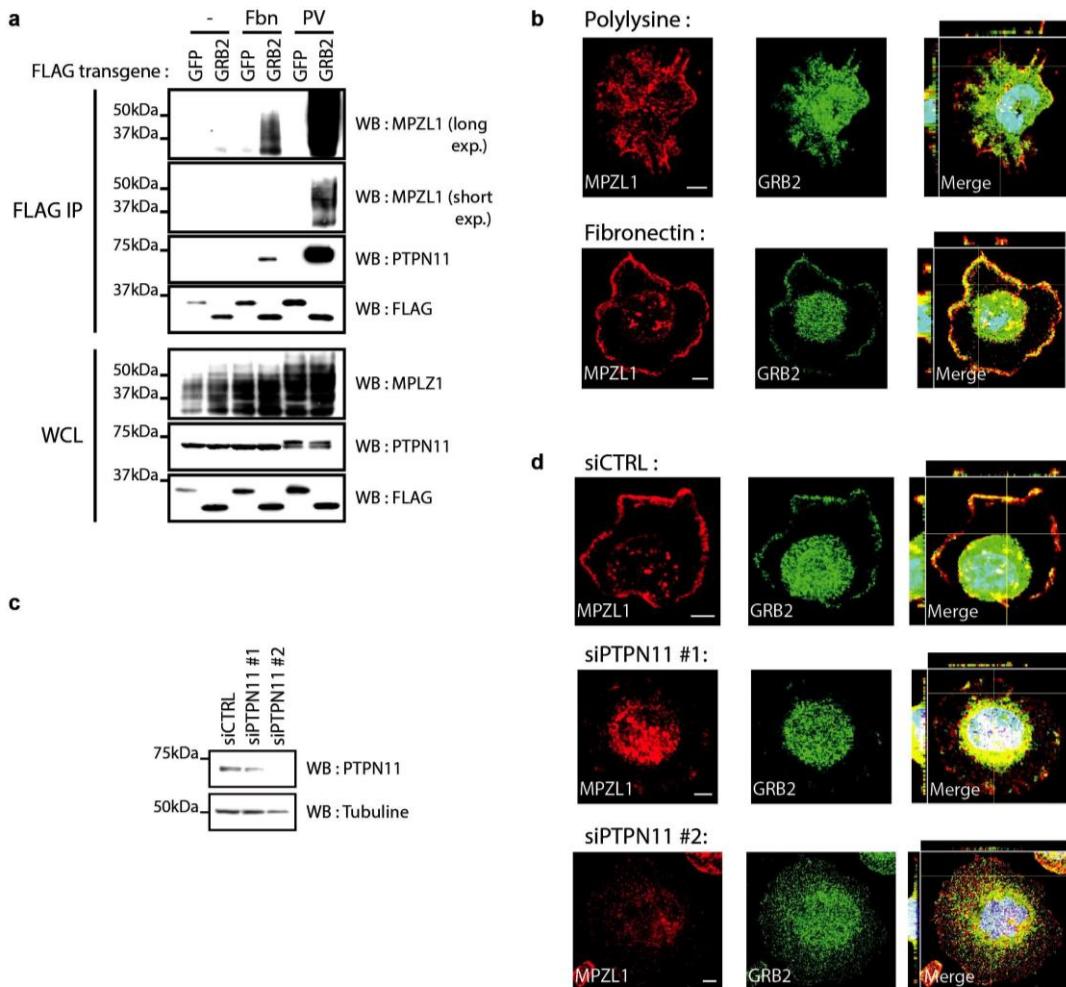


Figure 2.4. Cell adhesion on fibronectin triggers GRB2-MPZL1 complex formation at the plasma membrane.

(a) HEK293T cells expressing FLAG-GFP or GRB2 were seeded on plastic or fibronectin for ten minutes before lysis. PV treated cells were used as a positive control. FLAG APs were performed for each condition and analyzed by Western blot as indicated. (b) HCC1954 cells were seeded on polylysine or fibronectin for 15 minutes before fixation. Immunofluorescence against GRB2 and MPZL1 was performed to assess the cellular localization. Confocal images of the *z*-axes (indicated by yellow lines) are shown on the left side (*y-z* axis) or on top (*x-z* axis) of the panels showing merged images, for which nuclei were stained with DAPI. Representative images are presented (scale bar = 5 μ m). (c) HCC1954 cells were depleted of endogenous PTPN11 using DsiRNAs. (d) PTPN11-depleted cells were seeded on fibronectin for 15 minutes prior to fixation and

immunofluorescence. Confocal images of the z -axes (indicated by yellow lines) are shown on the left side ($y-z$ axis) or on top ($x-z$ axis) of the panels showing merged images, for which nuclei were stained with DAPI. Representative images are shown (scale bar = 5 μm).

To extend this observation to HCC1954 cells, we assessed MPZL1 and GRB2 localization via immuno-fluorescence following attachment. MPZL1 and GRB2 were rather ubiquitously distributed in cells seeded on polylysine (Fig. 2.4b). In contrast, adhesion to fibronectin induced a colocalization of MPZL1 and GRB2 at the plasma membrane. Moreover, under this condition both proteins also localized in the nucleus; this was particularly evident for GRB2. To examine the requirement for PTPN11 in complex formation in HER2+ breast cancer cells, we analyzed GRB2 and MPZL1 localization in cells depleted of PTPN11 (Fig. 2.4c). We found that the proteins did not colocalize at the plasma membrane following PTPN11 knockdown when compared to controls (Fig. 2.4d). Together, our data indicate that the colocalization of GRB2 and MPZL1 at the plasma membrane in fibronectin-adhering cells depend on their ability to associate via PTPN11. Thus, our data along with previous findings lead us to propose a model where cell attachment to fibronectin induces the association between GRB2 and PTPN11, which are further recruited to MPZL1 at the plasma membrane to form a functional signalling complex.

2.6. Discussion

We have used AP-MS to map a GRB2-centric protein interaction network in HER2+ breast cancer cells. We have identified GRB2 SH2-dependent interactors HER2, EGFR, PTPN11 and SHC1 in protein complexes via AP-MS from cultured HCC1954 cells, without stimulation or phosphatase inhibition. This observation confirmed that HER2 overexpression in these cells induces pTyr levels that are sufficient to nucleate GRB2 signalling complexes. This study and previous investigations on GRB2 signalling networks using quantitative mass spectrometry in HER2 -negative cells clearly revealed that these SH2-dependent partners are usually not found in non-stimulated cells²⁸ (Fig. 2.2a). Here, we found that HER2 overexpression was sufficient to initiate assembly of GRB2-centric protein interaction networks.

In addition to confirming a number of SH2- and SH3-dependent components of GRB2 signalling networks, our work revealed five new GRB2 binding partners. Among them, we found the membrane-associated glycoprotein MPZL1. Its association with GRB2 required either cell attachment on fibronectin, or treatment with a phosphatase inhibitor. This suggested that HER2 activation is not sufficient to induce MPZL1 phosphorylation on Tyr residues 241 and 263, which are required to sustain complex formation. This finding was surprising since it was previously reported that SRC activation may lead to MPZL1 phosphorylation^{19,23}. This activation of SRC was shown to happen either by a direct interaction with the cytoplasmic domain of integrins³³, or in the context of HER2 overexpression³⁴. Although it did not seem to be the case here, it remains possible that SRC regulates MPZL1 signalling. Consistent with this, it was described that MPZL1 stable overexpression led to SRC and SHP2 activation, the former being required for the regulation of migration and invasion of hepatocellular carcinoma cells dependent on cortactin²¹, which was also previously identified as a GRB2 binding partner³⁵.

Interestingly, we have shown that the GRB2 association with MPZL1 relies predominantly on the phosphorylation of Tyr 241 on the latter, and less so on Tyr 263. This is contrary to reports suggesting that both residues are equally important for their association with PTPN11 SH2 domains³². Therefore, it remains possible that PTPN11 may not be the sole intermediate bridging GRB2 and MPZL1. Further experiments, including MPZL1 interactome mapping, will be required to identify putative additional components of this functional signalling complex.

In addition to MPZL1, a few other novel GRB2-associated proteins that we identified in our MS experiments were linked with breast cancer. The STAP2 adaptor contains an SH2-like domain. It is also a substrate for tyrosine kinase PTK6⁴³, which is overexpressed in a significant fraction of breast tumors^{44, 45}. It was reported that STAP2 depletion significantly decreases proliferation of breast cancer cells^{46, 47}. The Rho guanine nucleotide exchange factor (GEF) ARHGEF35 (ARHGEF5-like) is another intriguing candidate due to its high similarity with ARHGEF5, which was also unambiguously identified in our analysis of GRB2 signalling networks (Fig. 2.1c). ARHGEF5 was previously shown to promote breast malignancy⁴⁸. Both Rho GEFs are overexpressed in a significant proportion of breast

tumors^{45, 49}. STAP2 and ARHGEF35 represent two interesting candidates that might play important roles in GRB2-dependent HER2 oncogenic signalling.

Overall, our discovery that the MPZL1-PTPN11-GRB2 complex formation is regulated by cell adhesion on fibronectin is consistent with the implication of GRB2 in integrin signalling^{36,37}. This is also supported by the colocalization at the plasma membrane of GRB2 and MPZL1 upon cell adhesion on fibronectin (Fig. 2.4b). Further investigations will be required to establish the biological repercussions of the GRB2-MPZL1 association. The importance of MPZL1 for GRB2-PTPN11 localization in cells adhering to fibronectin, as well as its requirement for the activation of oncogenic signalling downstream of GRB2 in the context of HER2+ breast cancer are key questions that will need to be addressed.

2.7. Methods

2.7.1. Constructs

Human GRB2 (NCBI clone NM_002086) was subcloned into pMSCVpuro (Clontech) with an N-terminal 3xFLAG epitope tag (Sigma) to generate stable cell lines. The following cDNAs were subcloned into the pcDNA3.1- vector (Invitrogen) with a 3xFLAG or a GFP (Clontech) epitope tag: MPZL1 (BC007881), PTPN11 (Addgene #8381, Ben Neel). Point mutations were introduced using the QuickChange II strategy (Stratagene). All inserts were fully sequenced and protein expression was verified. The DsiRNA (IDT) sequences targeting PTPN11 were as follows (Seq#1 : Sense : rCrGrCrUrArArGrArGrArArCrUrUrArArArCrUrUrCrAAA; Antisense : rUrUrUrGrArArArGrUrUrUrArArGrUrCrUrCrUrUrArGrCrGrUrA; Seq#2 : Sense : rCrArArGrArArCrArGrArCrGrCrArArGrAArArGrUrUrUAT; Antisense : rArUrArArArCrUrUrUrCrUrUrGrCrGrUrCrUrGrUrUrCrUrUrGrArU). Non-targeting DsiRNAs (IDT) were used as negative controls.

2.7.2. Cell culture and transfection

HCC1954 and HEK293T cells were obtained from ATCC and cultured as recommended by the manufacturer. Transfections were performed using polyethylenimine (PEI) for HEK293T

or AMAXA 4D nucleofection (Lonza) for HCC1954. Stable HCC1954 cells were selected with puromycin (0.75 µg/mL) for two weeks. Individual clones were picked and selected based on transgene expression. DsiRNAs (10nM) were transfected using Jetprime (Polyplus) for HEK293T following manufacturer's guidelines, or using Lipofectamine 2000 (ThermoFisher) for HCC1954, as described²⁰.

2.7.3. Cell adhesion on fibronectin

Fibronectin 20 µg/mL (Sigma -Aldrich) or 0.01% polylysine (Sigma-Aldrich) solutions were used to coat petri dishes or glass coverslips for 1 hour at 37°C. HEK293T or HCC1954 cells were resuspended with 0.2% trypsin (Invitrogen) for 1-5 minutes at 37°C, pelleted and resuspended in serum- free medium. Cell solutions were incubated at 37°C for 30 minutes with agitation, prior to seeding on fibronectin or polylysine-coated surfaces for 10 or 15 minutes before cell lysis or fixation, respectively.

2.7.4. Cell lysis and affinity purification

Cells were grown to 95% confluence prior to lysis. Tyrosine phosphatase inhibition was achieved by addition of 100 µM sodium orthovanadate (Sigma-Aldrich) pre-activated with 30% H2O2 (1: 200) to cell medium for 20 minutes. Cells were washed with ice cold PBS before lysis. Proteins were extracted by scraping the cells in ice-cold lysis buffer, as described elsewhere³⁸, and normalized according to their protein concentrations as measured by Lowry. Lysates were incubated for 1h30 at 4°C with M2 affinity resin (Sigma) for FLAG APs. For endogenous APs, lysates were incubated with 5 µg of antibody overnight at 4°C. Protein G - coupled Dynabeads® (Thermo) were then added and incubated for 30 minutes at 4°C. Beads were washed three times with lysis buffer. For Western blotting, beads were resuspended in 4x Laemmli buffer. For MS experiments, beads were additionally washed twice with 20 mM Tris pH 7.4 and proteins were eluted by incubating with agitation at 4°C with 50mM H3PO4 before digestion.

2.7.5. Western Blotting and antibodies

Proteins were resolved on 8 to 15% polyacrylamide gels and transferred onto nitrocellulose membranes (GE Healthcare). Loading was verified with Ponceau S (Sigma- Aldrich) staining. Membranes were blocked in 5% non fat milk in TBS for 1 hour at room temperature before being incubated with antibodies overnight at 4 °C in TBS-T supplemented with 5% BSA or 1% non fat milk according to manufacturer recommendations. Antibodies used were as follows: mouse GRB2 (BD Bioscience), rabbit PTPN11 (Santa Cruz), rabbit MPZL1 (Cell Signalling Technology), mouse tubuline (Cell Signalling Technology) or goat dynamin 2 (Santa Cruz). Membranes were washed with TBS-T before being incubated for 1 hour at room temperature with the following HRP-linked antibodies diluted in 1% milk in TBS-T : anti-FLAG M2 (Sigma-Aldrich), horse anti-mouse IgG (Cell Signalling Technology), goat anti-rabbit (Cell Signalling Technology) or rabbit anti-goat IgG (Thermo). Signal was revealed using BioRad Clarity Western ECL substrate and detected either on Hyblot CL autoradiography films (Denville) or with an Amersham Imager 600RGB (GE Healthcare). Signal quantification was performed using Image J software gel analysis tools (NIH).

2.7.6. Immunofluorescence

Following cell adhesion, coverslips were washed twice with PBS and fixed with 4% paraformaldehyde pH 7.4 (BioShop) for 15 minutes at room temperature. After three washes with PBS, fixed cells were permeabilized using 0.2% Triton (Sigma-Aldrich) for 15 minutes at room temperature. Coverslips were blocked in PBS supplemented with 10% normal goat serum (Wisent) and 0.1% NP40 (Sigma-Aldrich) for 1 hour at room temperature and incubated with the following antibodies diluted in blocking solution: mouse FLAG (Sigma-Aldrich); mouse GRB2 (BD Biosciences), rabbit GRB2 (Santa Cruz) or rabbit MPZL1 (Cell Signalling Technology) for 1 hour at room temperature and then overnight at 4°C. After washes in 0.1% NP40 in PBS, coverslips were incubated with Alexa 568-conjugated goat anti-rabbit (Invitrogen) or Alexa 488-conjugated goat anti-mouse (Cell Signalling Technology) antibodies for 1 hour at room temperature. They were washed three times with 0.1% NP40 in PBS and twice with PBS before being mounted on slides using ProLong Gold

antifade with DAPI (Thermo Fisher). Pictures were acquired with an Olympus FV1000 using the FluoView software or with a Nikon Eclipse E600 imaging system using MetaView.

2.7.7. Mass spectrometry sample preparation and analysis

Samples for mass spectrometry were prepared as detailed elsewhere³⁸. Identification of the proteins was carried out on a 5600+ TripleTOF mass spectrometer (Sciex) with a nanoelectrospray ion source and coupled to a Ekspert NanoLC425 reversed-phase nanoscale capillary liquid chromatography (Eksigent). Digested peptides were separated on a nano cHiPLC column (3u, 120A C18, 15 cm x 0.075 mm internal diameter). Peptides were eluted in a 90-minute linear gradient of 5-35% of solvent B (acetonitrile, 0.1% formic acid) at 300 nL/min. Mass spectra were acquired using a data dependent acquisition mode using Analyst version 1.7 (Sciex). Each full scan mass spectrum (400 to 1250 m/z) was followed by collision-induced dissociation of the twenty most intense ions. Dynamic exclusion was set for a period of 12 seconds and a tolerance of 100 ppm.

MS/MS peak lists were generated using Protein Pilot version 5.0 (Sciex). MGF sample files were then analyzed using Mascot (Matrix Science, London, UK; version 2.4.0) and X! Tandem (The GPM, thegpm.org; version CYCLONE (2010.12.01.1). Both were set up to search against the Uniprot *Homo sapiens* reference proteome (March 2014 release, 69150 entries) assuming the digestion enzyme trypsin. The protein sequences of the GFP and GRB2 FLAG-tagged constructs were added to the database to estimate coverage.

Databases were searched with a fragment ion mass tolerance of 0.100 Da and a parent ion tolerance of 0.100 Da. Carbamidomethylation of cysteine was specified as a fixed modification for all samples. Oxidation of methionine and phosphorylation of serine, threonine and tyrosine were specified as variable modifications for all samples. Conversion of glutamate and glutamine to pyroglutamate and deamidation of asparagine and glutamine were specified as variable modification for a subset of samples. Two missed cleavages were allowed. Scaffold version 4.7.5 (Proteome Software Inc.) was used to validate MS/MS based peptide and protein identifications. Protein identifications were accepted if they could be established at greater than 98% probability to achieve a FDR less than 1% and contained at least 1 identified peptide. Protein probabilities were assigned by the Protein Prophet

algorithm⁴⁰. Proteins that contained similar peptides and could not be differentiated based on MS/MS analysis alone were grouped to satisfy the principles of parsimony.

Gene names for each of the validated proteins and their corresponding spectral counts in samples of each of three replicates were exported as a matrix according to SAINT algorithm guidelines²⁷. SAINT express statistical analyses of the biological triplicates were performed with inclusion of the internal 3xFLAG-GFP controls, and proteins presenting a SAINT score above 0.9 were considered *bona fide* interactors. Each relationship between bait (GRB2) and prey (each validated protein) was represented in the final network with Cytoscape software (version 3.5.0)⁴¹. Known interactions between the proteins included in the GRB2 network were imported using the Cytoscape plugin tool Bisogenet⁴².

2.8. References

1. Harari, D. & Yarden, Y. Molecular mechanisms underlying ErbB2/HER2 action in breast cancer. *Oncogene* **19**, 6102–6114 (2000).
2. Slamon, D. J. *et al.* Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science* **235**, 177–182 (1987).
3. Dankort, D. *et al.* Grb2 and Shc Adapter Proteins Play Distinct Roles in NEU (ErbB-2)-Induced Mammary Tumorigenesis: Implications for Human Breast Cancer. *Mol. Cell. Biol.* **21**, 1540–1551 (2001).
4. Dankort, D. L., Wang, Z., Blackmore, V., Moran, M. F. & Muller, W. J. Distinct tyrosine autophosphorylation sites negatively and positively modulate neu-mediated transformation. *Mol. Cell. Biol.* **17**, 5410–5425 (1997).
5. Pietras, R. J. *et al.* Antibody to HER-2/neu receptor blocks DNA repair after cisplatin in human breast and ovarian cancer cells. *Oncogene* **9**, 1829–1838 (1994).
6. Balduzzi, S. *et al.* Trastuzumab-containing regimens for metastatic breast cancer. in *Cochrane Database of Systematic Reviews* (John Wiley & Sons, Ltd, 2014).
7. Slamon, D. J. *et al.* Use of Chemotherapy plus a Monoclonal Antibody against HER2 for Metastatic Breast Cancer That Overexpresses HER2. *N. Engl. J. Med.* **344**, 783– 792 (2001).
8. Chung, A., Cui, X., Audeh, W. & Giuliano, A. Current status of anti-human epidermal growth factor receptor 2 therapies: predicting and overcoming herceptin resistance. *Clin. Breast Cancer* **13**, 223–232 (2013).

9. Prat, A. *et al.* Clinical implications of the intrinsic molecular subtypes of breast cancer. *The Breast* **24**, Supplement 2, S26–S35 (2015).
10. Northey, J. J. *et al.* Signaling through ShcA Is Required for Transforming Growth Factor β - and NEU/ErbB-2-Induced Breast Cancer Cell Motility and Invasion. *Mol. Cell. Biol.* **28**, 3162–3176 (2008).
11. Peles, E., Lamprecht, R., Ben-Levy, R., Tzahar, E. & Yarden, Y. Regulated coupling of the NEU receptor to phosphatidylinositol 3'-kinase and its release by oncogenic activation. *J. Biol. Chem.* **267**, 12266–12274 (1992).
12. Lowenstein, E. J. *et al.* The SH2 and SH3 domain-containing protein GRB2 links receptor tyrosine kinases to ras signaling. *Cell* **70**, 431–442 (1992).
13. Songyang, Z. *et al.* Specific motifs recognized by the SH2 domains of Csk, 3BP2, fps/fes, GRB-2, HCP, SHC, Syk, and Vav. *Mol. Cell. Biol.* **14**, 2777–2785 (1994).
14. Buday, L. & Downward, J. Epidermal growth factor regulates p21ras through the formation of a complex of receptor, Grb2 adapter protein, and Sos nucleotide exchange factor. *Cell* **73**, 611–620 (1993).
15. Cheng, A. M. *et al.* Mammalian Grb2 Regulates Multiple Steps in Embryonic Development and Malignant Transformation. *Cell* **95**, 793–803 (1998).
16. Dharmawardana, P. G., Peruzzi, B., Giubellino, A., Burke, T. R., Jr & Bottaro, D. P. Molecular targeting of growth factor receptor-bound 2 (Grb2) as an anti-cancer strategy. *Anticancer. Drugs* **17**, 13–20 (2006).
17. Giubellino, A. *et al.* Inhibition of Tumor Metastasis by a Growth Factor Receptor Bound Protein 2 Src Homology 2 Domain–Binding Antagonist. *Cancer Res.* **67**, 6012–6016 (2007).
18. Zhao, Z. J. & Zhao, R. Purification and cloning of PZR, a binding protein and putative physiological substrate of tyrosine phosphatase SHP-2. *J. Biol. Chem.* **273**, 29367–29372 (1998).
19. Zhao, R., Guerrah, A., Tang, H. & Zhao, Z. J. Cell surface glycoprotein PZR is a major mediator of concanavalin A-induced cell signaling. *J. Biol. Chem.* **277**, 7882–7888 (2002).
20. Lapin, V. *et al.* Kinome-wide screening of HER2+ breast cancer cells for molecules that mediate cell proliferation or sensitize cells to trastuzumab therapy. *Oncogenesis* **3**, e133 (2014).
21. Jia, D. *et al.* Amplification of MPZL1/PZR promotes tumor cell migration through Src-mediated phosphorylation of cortactin in hepatocellular carcinoma. *Cell Res.* **24**, 204–217 (2014).
22. Roubelakis, M. G., Martin-Rendon, E., Tsaknakis, G., Stavropoulos, A. & Watt, S. M. The murine ortholog of the SHP-2 binding molecule, PZR accelerates cell migration on

fibronectin and is expressed in early embryo formation. *J. Cell. Biochem.* **102**, 955–969 (2007).

23. Eminaga, S. & Bennett, A. M. Noonan Syndrome-associated SHP-2/Ptpn11 Mutants Enhance SIRP and PZR Tyrosyl Phosphorylation and Promote Adhesion-mediated ERK Activation. *J. Biol. Chem.* **283**, 15328–15338 (2008).
24. Zannettino, A. C. W. *et al.* Novel mesenchymal and haematopoietic cell isoforms of the SHP-2 docking receptor, PZR: identification, molecular cloning and effects on cell migration. *Biochem. J.* **370**, 537–549 (2003).
25. Blume-Jensen, P. & Hunter, T. Oncogenic kinase signalling. *Nature* **411**, 355–365 (2001).
26. Del Rosario, A. M. & White, F. M. Quantifying oncogenic phosphotyrosine signaling networks through systems biology. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **20**, 23–30 (2010).
27. Choi, H. *et al.* Analyzing Protein-Protein Interactions from Affinity Purification-Mass Spectrometry Data with SAINT. in *Current Protocols in Bioinformatics* (eds. Baxevanis, A. D., Petsko, G. A., Stein, L. D. & Stormo, G. D.) (John Wiley & Sons, Inc., 2012).
28. Bisson, N. *et al.* Selected reaction monitoring mass spectrometry reveals the dynamics of signaling through the GRB2 adaptor. *Nat. Biotechnol.* **29**, 653–658 (2011).
29. Stark, C. *et al.* BioGRID: a general repository for interaction datasets. *Nucleic Acids Res.* **34**, D535 (2006).
30. Debily, M.-A. Expression and molecular characterization of alternative transcripts of the ARHGEF5/TIM oncogene specific for human breast cancer. *Hum. Mol. Genet.* **13**, 323–334 (2003).
31. Ikeda, O. *et al.* Interactions of STAP2 with Brk and STAT3 Participate in Cell Growth of Human Breast Cancer Cells. *J. Biol. Chem.* **285**, 38093–38103 (2010).
32. Zhao, R. & Zhao, Z. J. Dissecting the Interaction of SHP-2 with PZR, an Immunoglobulin Family Protein Containing Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibitory Motifs. *J. Biol. Chem.* **275**, 5453–5459 (2000).
33. Arias-Salgado, E. G. *et al.* Src kinase activation by direct interaction with the integrin β cytoplasmic domain. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **100**, 13298–13302 (2003).
34. Rexer, B. N. *et al.* Phosphoproteomic mass spectrometry profiling links Src family kinases to escape from HER2 tyrosine kinase inhibition. *Oncogene* **30**, 4163–4174 (2011).
35. Brehme, M. *et al.* Charting the molecular network of the drug target Bcr-Abl. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **106**, 7414–7419 (2009).
36. Cheng, S. Y. S., Sun, G., Schlaepfer, D. D. & Pallen, C. J. Grb2 Promotes Integrin-Induced Focal Adhesion Kinase (FAK) Autophosphorylation and Directs the

Phosphorylation of Protein Tyrosine Phosphatase by the Src-FAK Kinase Complex. *Mol. Cell. Biol.* **34**, 348–361 (2014).

37. Schlaepfer, D. D., Hanks, S. K., Hunter, T. & van der Geer, P. Integrin-mediated signal transduction linked to Ras pathway by GRB2 binding to focal adhesion kinase. *Nature* **372**, 786–791 (1994).
38. Beigbeder, A., Vélot, L., James, D. A. & Bisson, N. Sample Preparation for Mass Spectrometry Analysis of Protein-Protein Interactions in Cancer Cell Lines and Tissues. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* **1458**, 339–347 (2016).
39. Keller, A., Nesvizhskii, A. I., Kolker, E. & Aebersold, R. Empirical statistical model to estimate the accuracy of peptide identifications made by MS/MS and database search. *Anal. Chem.* **74**, 5383–5392 (2002).
40. Nesvizhskii, A. I., Keller, A., Kolker, E. & Aebersold, R. A statistical model for identifying proteins by tandem mass spectrometry. *Anal. Chem.* **75**, 4646–4658 (2003).
41. Shannon, P. *et al.* Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Res.* **13**, 2498–2504 (2003).
42. Martin, A. *et al.* BiSGenET: a new tool for gene network building, visualization and analysis. *BMC Bioinformatics* **11**, 91 (2010).
43. Mitchell, P. J., Sara, E. A. & Crompton, M. R. A novel adaptor-like protein which is a substrate for the non-receptor tyrosine kinase, BRK. *Oncogene* **19**, 4273–4282 (2000).
44. Barker, K. T., Jackson, L. E. & Crompton, M. R. BRK tyrosine kinase expression in a high proportion of human breast carcinomas. *Oncogene* **15**, 799–805 (1997).
45. Gao, J. *et al.* Integrative analysis of complex cancer genomics and clinical profiles using the cBioPortal. *Sci. Signal.* **6**, pl1 (2013).
46. Ikeda, O. *et al.* Interactions of STAP2 with Brk and STAT3 Participate in Cell Growth of Human Breast Cancer Cells. *J. Biol. Chem.* **285**, 38093–38103 (2010).
47. Ikeda, O. *et al.* Involvement of STAP 2 in Brk mediated phosphorylation and activation of STAT5 in breast cancer cells. *Cancer Sci.* **102**, 756–761 (2011).
48. Komiya, Y. *et al.* The Rho guanine nucleotide exchange factor ARHGEF5 promotes tumor malignancy via epithelial-mesenchymal transition. *Oncogenesis* **5**, e258 (2016).
49. Debily, M.-A. Expression and molecular characterization of alternative transcripts of the ARHGEF5/TIM oncogene specific for human breast cancer. *Hum. Mol. Genet.* **13**, 323–334 (2003).

Acknowledgements

We thank members of the Bisson laboratory for discussions. Mass spectrometry was performed at the CHU de Québec – Université Laval Proteomics Platform. A.B. held a Pierre J. Durand scholarship. This work was funded by an Operating Grant from the Canadian Institutes for Health Research (CIHR) to N.B. (MOP-130335). N.B. was also supported by Leader's Opportunity Funds from the Canada Foundation for Innovation (30308, 34963), holds a Canada Research Chair (Tier 2) in Cancer Proteomics, and previously a Junior 1 salary award from the Fonds de Recherche du Québec-Santé (FRQ-S) with funds from the Quebec Breast Cancer Foundation.

Author contributions statement

A.B. and N.B. conceived the project. A.B., F.J.M.C. and N.B. designed the experiments. A.B. and F.J.M.C. performed the experiments. A.B. and F.J.M.C. analyzed the data. A.B. and N.B. wrote the paper. All authors read and approved the manuscript.

Data availability statement

The datasets generated are available from the corresponding author on request.

Additional statement

The authors declare no competing financial interests.

3. Chapitre 3 : Analyse protéomique des modifications dans les réseaux d’interaction de GRB2 dans des modèles de progression tumorale du cancer du sein HER2+

Tel que présenté auparavant, la protéine adaptatrice GRB2 est impliquée dans le contrôle de nombreuses fonctions cellulaires dérégulées dans le cancer, comme la prolifération, l’apoptose, l’adhésion ou encore la migration cellulaires. Dans le cancer du sein, et plus particulièrement le cancer mammaire HER2+, de nombreuses études ont de plus souligné l’implication de GRB2 dans le processus métastatique (Cheng et al., 1998; Dankort et al., 2001; Giubellino et al., 2007), notamment via la participation de cette protéine adaptatrice dans la transition épithélio-mésenchymateuse induite par le TGF β (Galliher and Schiemann, 2007; Galliher-Beckley and Schiemann, 2008; Khouri et al., 2001). D’autre part, différentes études ont décrit le rôle de GRB2 dans la modulation de plusieurs voies de signalisation en fonction de la matrice extracellulaire, notamment dans la glande mammaire (Barcus et al., 2013; Cheng et al., 2014; Galbaugh et al., 2010; Minoo et al., 2003). Afin de caractériser les réseaux de signalisation de GRB2 et leurs potentielles modifications au cours de la progression tumorale du cancer du sein HER2+, nous avons utilisé des modèles de progression tumorale reflétant ces deux rôles majeurs de GRB2. Le premier modèle utilisé est un modèle de transition épithélio-mésenchymateuse *in vitro* (section 1.3.3.2). Brièvement, il a été démontré que différents modèles cellulaires de cancer du sein HER2+ subissent *in vitro* des modifications morphologiques importantes sous l’action du TGF β , et adoptent alors un phénotype proche de cellules mésenchymateuses (Galliher and Schiemann, 2007; Northey et al., 2008). Ce modèle dépend à la fois de la signalisation induite par HER2 (Northey et al., 2008) et de GRB2 (Galliher and Schiemann, 2007; Galliher-Beckley and Schiemann, 2008), et permet de modéliser l’une des étapes cruciales du processus métastatique (Micalizzi et al., 2010). Le second modèle sélectionné pour nos travaux est un modèle de xénogreffes orthotopiques (section 1.3.3.4.2), permettant de récapituler les interactions tumeur-stroma de la glande mammaire (Gilbert and Gordon, 1983; Vargo-Gogola and Rosen, 2007).

3.1. Les réseaux de GRB2 sont modifiés par le traitement au TGF β dans un modèle de transition épithélio-mésenchymateuse *in vitro*

Il est établi que le récepteur HER2 est impliqué dans la progression tumorale, non seulement au niveau de l'initiation en tant qu'oncogène, mais également dans le processus métastatique (Dankort et al., 2001). De nombreuses évidences mettent d'ailleurs en avant le dialogue entre le récepteur au TGF β de type II (T β R-II) et HER2 dans la transition épithélio-mésenchymateuse, processus fondamental de l'acquisition des capacités migratoires et invasives nécessaires à la formation de métastases. Il a effectivement été décrit que des cellules normales (non transformées) de glande mammaire murine (NMuMG), peuvent être transformées par l'expression de la forme constitutivement active du récepteur murin ErbB2/NEU V664E, couramment appelée NEU-NT. En présence de TGF β , ces cellules cancéreuses HER2+ subissent un changement d'expression de marqueurs épithéliaux pour des marqueurs mésenchymateux, tels que la vimentine. Ces cellules présentent également une forte augmentation de leurs capacités migratoires et invasives, ainsi que de leur aptitude à établir des métastases pulmonaires (Northey et al., 2008, 2013). À l'inverse, des cellules NMuMG ne surexprimant pas le récepteur oncogénique ne démontrent pas de changement phénotypique dans ces conditions (Northey et al., 2008, 2013). L'acquisition de propriétés mésenchymateuses par les cellules en présence de TGF β , impliquée dans la transition épithélio-mésenchymateuse et le processus métastatique *in vivo*, a ainsi été proposé comme modèle de transition épithélio-mésenchymateuse *in vitro*.

Par la suite, cette transition épithélio-mésenchymateuse induite par le TGF β a été appliquée dans différentes lignées de cancer du sein HER2+, notamment dans les cellules HCC1954, utilisées comme modèle de cancer du sein HER2+ précédemment dans nos travaux (Beigbeder et al., 2017; Dumont and Arteaga, 2000; Ngan et al., 2013). Ce modèle a ainsi permis de démontrer que ce phénomène dépend de l'activation de HER2, mais également du recrutement indirect de GRB2, via la protéine SHC, au récepteur HER2 (Northey et al., 2013) ainsi que de l'interaction de cette protéine adaptatrice avec le récepteur T β R-II du TGF β (Galliher-Beckley and Schiemann, 2008). Compte tenu du rôle prépondérant de HER2 (Northey et al., 2008) et de GRB2 (Galliher and Schiemann, 2007;

Galliher-Beckley and Schiemann, 2008) dans cette transition épithélio-mésenchymateuse induite par le TGF β , ce modèle s'imposait donc comme un modèle de choix.

Dans un premier temps, nous avons donc caractérisé les réseaux d'interaction de GRB2 dans le modèle de transition épithélio-mésenchymateuse induit par le TGF β , pour apporter une preuve de concept à notre hypothèse initiale. Cette dernière postule en effet que la surexpression de HER2 dans le cancer du sein modifie les complexes signalétiques centralisés par GRB2, permettant le soutien de la signalisation pro-tumorale dépendante de HER2.

3.1.1. Établissement d'un modèle de transition épithélio-mésenchymateuse compatible avec les analyses de MS

Afin de caractériser les réseaux d'interactions de GRB2, nous avons choisi d'appliquer la méthode d'AP-MS décrite dans le chapitre 2. Pour cela, il était crucial d'adapter le modèle de transition épithélio-mésenchymateuse par traitement au TGF β , qui est optimal à faible confluence cellulaire en absence de facteurs de croissance, conditions limitantes pour la caractérisation des partenaires de GRB2 par AP-MS. En effet, les HCC1954, comme différentes lignées cellulaires, présentent une expression du marqueur mésenchymateux vimentine augmentée de façon importante lorsque traitées au TGF β à faible confluence cellulaire (10-20%) et en absence de sérum (Fig. 3.1D, Cichon et al., 2015; Masszi et al., 2004). Nous avons cherché à déterminer la cinétique d'augmentation de l'expression de la vimentine pendant le traitement au TGF β dans ces conditions. Ces expériences mettent en évidence une forte expression de la vimentine après 48h et 72h de traitement (Fig. 3.1A). Ces résultats concordent partiellement avec une étude précédente, qui avait déterminé que l'augmentation de la vimentine était maximale après 96h de traitement (Ngan et al., 2013).

Nous avons alors testé différentes conditions de confluence combinées à différentes séquences de traitement et de privation en sérum, en vue de conserver une augmentation optimale de l'expression de la vimentine tout en augmentant autant que possible la confluence cellulaire, afin de caractériser de façon fiable les interacteurs de GRB2 dans ces conditions. Les séquences de traitements de chaque protocole sont schématisées dans la figure 3.1B. On observe une augmentation du niveau de vimentine (Liu et al., 2015) dans les

cellules traitées par les protocoles 2, 3, 4, 5 et 6 par rapport aux cellules non traitées par le TGF β (protocole 1) (Fig. 3.1C). Le protocole 6 semble avoir induit une augmentation de ce marqueur mésenchymateux supérieure à celle observée dans les autres protocoles (Fig. 3.1C). Cette augmentation de l'expression de la vimentine est accompagnée d'une diminution du niveau de vinculine (marqueur épithéial, Li et al., 2014b) dans les cellules traitées selon les protocoles 5 et 6 uniquement (Fig. 3.1C).

La pénétrance du phénotype mésenchymateux dans chaque protocole a été déterminée par calcul de la proportion de cellules présentant des filaments de vimentine en immunofluorescence (Fig. 3.1D). Ces expériences ont montré qu'une faible proportion (11%) de cellules présentent des filaments de vimentine en absence de traitement par le TGF β (protocole 1). Cette proportion est grandement augmentée par le traitement au TGF β , dépassant 80% de la population dans les cellules traitées selon le protocole 3 et 6. Ces résultats indiquent que la séquence de traitement du protocole 6 induit des modifications phénotypiques comparables à un traitement par le TGF β à faible confluence cellulaire (protocole 3). Nous avons donc établi que le protocole 6 constitue la séquence de traitement optimale pour nos analyses, avec un prétraitement des cellules en suspension au TGF β avant ensemencement dans du milieu supplémenté en sérum, suivi 16h post-ensemencement d'une déplétion en sérum, avec renouvellement du TGF β toutes les 24 heures pendant 48h.

D'autre part, la déplétion en sérum conduit à une réduction drastique des interactions de GRB2 en aval (identifiés par AP-MS, données non montrées). La signalisation pro-tumorale de HER2 dépend de sa dimérisation avec les autres membres de sa famille, notamment EGFR (Schneider and Yarden, 2016). La stimulation de ce récepteur par l'EGF devrait permettre de rétablir le recrutement de GRB2 aux récepteurs de la famille HER activés par hétérodimérisation avec EGFR notamment, ainsi que les interactions phospho-dépendantes de GRB2. Nous avons donc choisi de complémenter la diminution des interactions de GRB2 dans ces conditions de privation en sérum par une stimulation EGF des cellules, afin d'induire l'assemblage de complexes de GRB2 dépendant de la signalisation par les récepteurs HER. La cinétique d'activation de ERK en réponse à l'EGF a été évaluée par suivi de pERK après différents temps de traitement à l'EGF (Fig. 3.1E). De façon intéressante, la phosphorylation de ERK dans la lignée HCC1954 est maximale après 5 minutes de traitement à l'EGF, et est maintenue jusqu'à 30 minutes après traitement (Fig 3.1.E). Ce profil d'activation soutenue

de ERK après stimulation à l'EGF diffère de celui observé pour des cellules ne surexprimant pas HER2, telles que les HEK293T (Bisson et al., 2011).

Nous avons donc choisi de réaliser la caractérisation des réseaux d'interactions de GRB2 dans des cellules traitées au TGF β selon le protocole 6, en effectuant une stimulation à l'EGF de 5 minutes avant la lyse cellulaire.

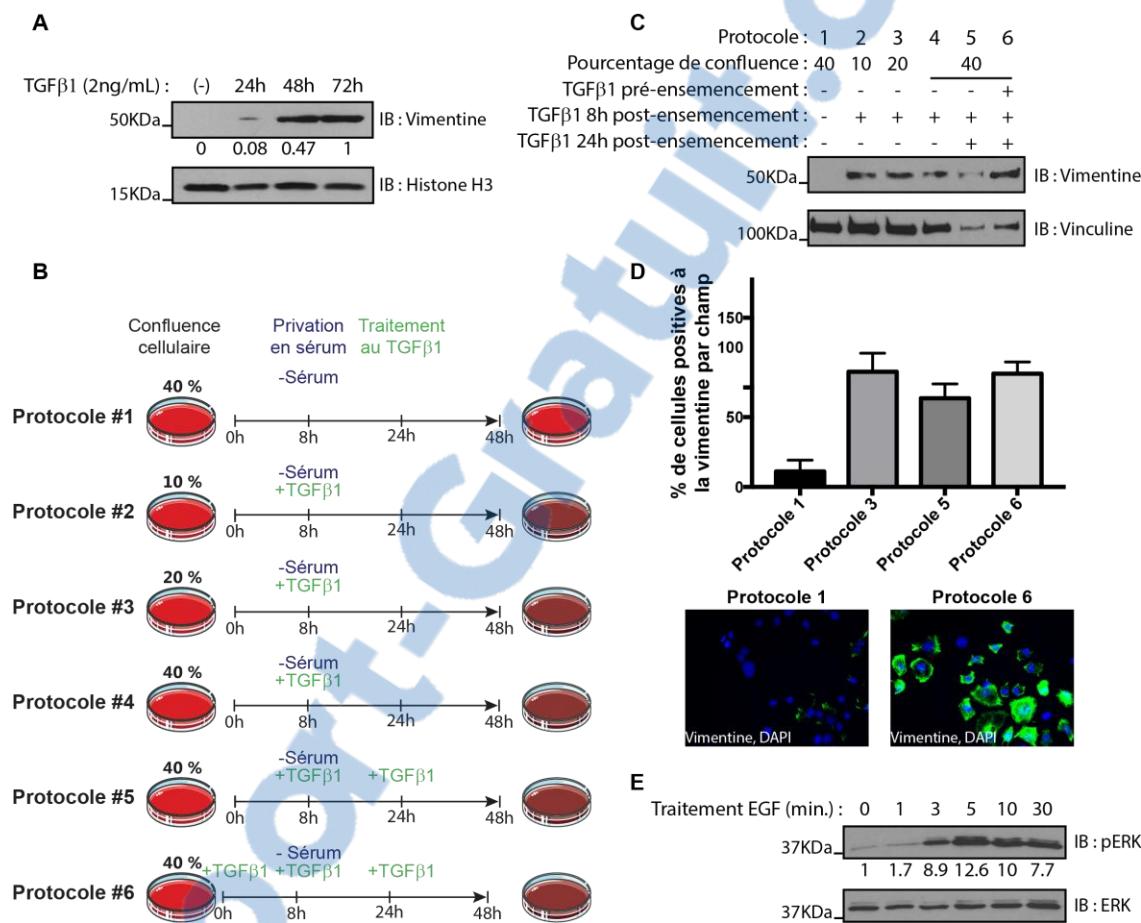


Figure 3.1 : Détermination de la séquence optimale de traitement au TGF β pour modéliser la transition épithélio-mésenchymateuse

A- Les cellules HCC1954 ont été traitées au TGF β pendant différents temps. Les niveaux d'expression de la vimentine et de l'histone H3 (contrôle) ont été visualisés par Western blot. B-D-Les cellules ont été traitées au TGF β selon différentes séquences de traitement, de privation en sérum et de confluence cellulaire représentées en (B). L'efficacité des différents traitements a été évaluée par suivi des niveaux d'expression de la vimentine (marqueur mésenchymateux) et de la vinculine (marqueur épithelial) par Western blot (C), et par suivi de la proportion de cellules présentant des filaments de vimentine en immunofluorescence (D). E- Les cellules HCC1954 ont été traitées à l'EGF (100ng/mL) pendant 1 à 30 minutes. L'activation de la voie ERK a été évaluée par suivi des niveaux relatifs de pERK et de ERK total par Western blot.

3.1.2. Analyse protéomique des réseaux de signalisation dépendants de GRB2 dans le modèle de transition épithélio-mésenchymateuse *in vitro*

Après avoir mis au point nos conditions de traitement, nous avons cherché à comparer les interactions de GRB2 dans des cellules humaines de cancer du sein HER2+ ayant acquis un phénotype mésenchymateux par rapport aux cellules non traitées. La lignée HCC1954 exprimant de façon stable la protéine de fusion 3xFLAG-GRB2 (Fig. 2.1) a été ensemencée à 40% de confluence avec ou sans TGF β et en présence de sérum. Après adhésion, les cellules ont été privées en sérum, en présence ou non de TGF β pendant 48h, selon la séquence de traitement optimal déterminée précédemment. Nous avons tout d'abord vérifié que les niveaux d'expression du transgène 3xFLAG-GRB2 n'étaient pas modifiés par ces traitements (Fig. 3.2A). Les niveaux d'expression de la vimentine dans chaque condition ainsi que la proportion de cellules présentant des filaments de vimentine ont été contrôlés dans chaque réplicat (Fig. 3.2A-C). Après une stimulation EGF de 5 minutes, des expériences d'AP-MS ont été réalisées sur les cellules traitées au TGF β et les cellules contrôles (non traitées au TGF β).

Les résultats de MS ont été analysés à l'aide de l'algorithme SAINT, qui attribue un score de probabilité d'interaction entre chaque partenaire identifié et GRB2 ainsi qu'un taux d'enrichissement relatif de ces partenaires dans chaque condition analysée. Étant donné que ces expériences n'incluaient pas de contrôles de spécificité d'interaction tels que la condition 3xFLAG-GFP, les résultats d'AP-MS de cellules HCC1954 exprimant cette protéine contrôle, obtenus précédemment (section 2.5.1), ont été inclus comme contrôle externe dans l'analyse statistique. De plus, la banque de données CRAPome des contaminants d'AP-MS FLAG dans différentes lignées cellulaires ont également inclus comme contrôles dans ces analyses (Mellacheruvu et al., 2013). Les résultats de ces expériences sont représentés dans un graphique de ressemblance (Fig. 3.2D).

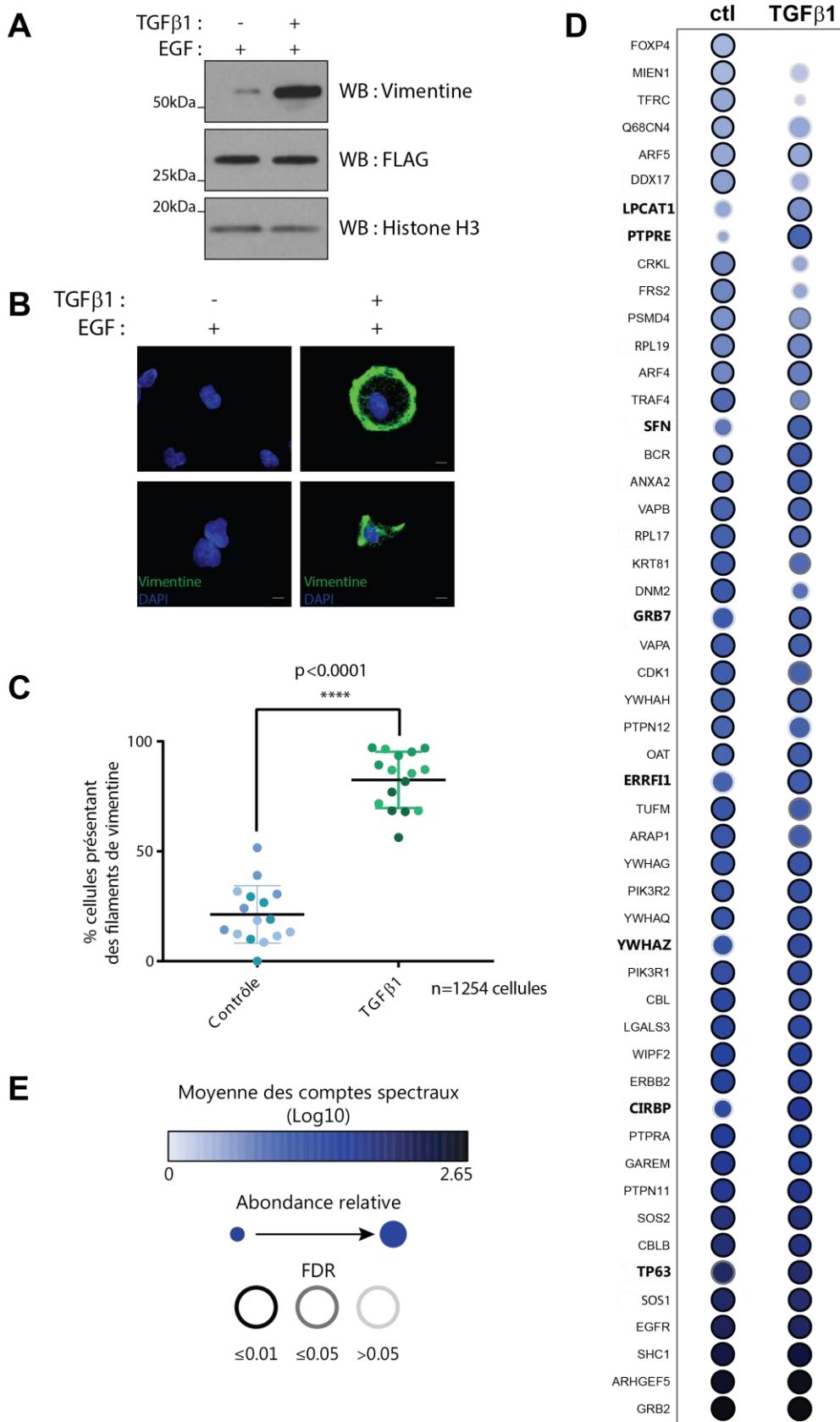
Ces expériences ont permis de valider neuf partenaires de GRB2 dont l'interaction est identifiée suite au traitement TGF β : LPCAT1, PTPRE, SFN, GRB7, ERRFI1, YWHAZ, CIRBP, TP63 et YWHAB. Ces interacteurs ne sont pas validés dans les cellules contrôles, ni dans nos expériences précédentes dans les HCC1954 avec ou sans traitement au PV (voir Fig. 2.1). Huit de ces nouveaux partenaires sont représentés en gras dans le graphique 3.2.D.

Parmi ces nouveaux interacteurs, la majorité (7/9) sont des partenaires de GRB2 recensés dans la littérature, tels que TP63 ou ERRFI1 (anciennement MIG-6), tous deux impliqués dans le processus métastatique et la transition épithélio-mésenchymateuse dans le cancer du sein (Dang et al., 2015; Izumchenko et al., 2014).

De plus, la comparaison des taux d'enrichissement de chaque interacteur dans les purifications de GRB2 dans les cellules traitées au TGF β et les cellules contrôles a également mis en évidence des diminutions dans l'intensité d'interaction de GRB2 avec certains de ses partenaires après la transition induite par le TGF β . Notamment, ces résultats ont souligné une diminution d'interaction importante de GRB2 avec la Dynamine 2 (DNM2), FRS2 et CRKL lors de la transition induite par le TGF β . Ces résultats suggèrent ainsi que les interactions de GRB2 sont effectivement modifiées lors de la transition induite par le TGF β .

Figure 3.2 : Les interactions des réseaux de signalisation de GRB2 sont modifiées par le traitement au TGF β mimant la transition épithélio-mésenchymateuse *in vitro*.

Les cellules HCC1954 exprimant de façon stable le transgène 3xFLAG-GRB2 ont été traitées au TGF β selon la séquence optimale déterminée auparavant, et stimulées à l'EGF pendant 5 minutes. Les cellules ont été lysées ou fixées et des analyses AP-MS ont été réalisées en triplicat. A- Les niveaux d'expression de la vimentine et du transgène ont été contrôlés dans chaque expérience par Western blot. B- Des IF anti-vimentine ont été réalisées sur des cellules de chaque expérience pour contrôler la proportion de cellules montrant l'acquisition d'un phénotype mésenchymateux. C- Les cellules présentant des filaments de vimentine ont été comptées dans chaque condition de chaque expérience du triplicat afin de s'assurer que plus de 75% des cellules traitées au TGF β présentaient un aspect mésenchymateux. Les résultats ont été analysés par un test de Student. D- Les résultats d'AP-MS dans les cellules non traitées au TGF β (ctl) et traitées (TGF β 1) ont été analysés par le l'algorithme SAINT et représentés sous forme de graphique de ressemblance grâce à l'outil Dot plot generator de ProHits-viz (Knight et al., 2017). E- Légende visuelle du graphique de ressemblance présenté en D. Chaque interaction proie/cible est représentée par un cercle. La couleur du pourtour du cercle correspond à la probabilité statistique de l'interaction, la taille du cercle reflète le ratio d'enrichissement relatif dans les complexes de GRB2 d'un interacteur donné dans chaque condition expérimentale. Enfin, la couleur intérieure du cercle représente l'abondance relative de l'interaction comparativement à l'abondance de toutes les interactions identifiées.



3.2. Les interactions de GRB2 avec ses partenaires sont modifiées lors de xénogreffes orthotopiques chez la souris

Ces dernières années, la vision du cancer en tant que maladie purement génétique a évolué afin de prendre en compte l'importance du microenvironnement dans l'initiation et la progression tumorale (Bissell et al., 2002). Ce microenvironnement cancéreux est parfois défavorable à la progression tumorale, constituant ainsi un niveau de défense supplémentaire (Bissell and Hines, 2011). Il peut cependant être intrinsèquement favorable à la Cancérogenèse (inflammation, tension de la matrice extracellulaire) ou bien être modifié par les cellules cancéreuses afin de soutenir la progression tumorale (Berie and Moses, 2006; Olumi et al., 1999; Wirtz et al., 2011). L'importance du microenvironnement dans la progression tumorale est soulignée par le nombre croissant de thérapies en phase clinique ciblant des composants du microenvironnement (Chen et al., 2015). Son implication dans la progression tumorale mammaire en particulier a été mis en évidence par de nombreuses études (Bissell et al., 2002, 2003; Bochet et al., 2013). Après avoir montré dans le sous-chapitre précédent que les réseaux d'interactions de GRB2 sont modifiés dans un modèle *in vitro* de transition épithélio-mésenchymateuse, nous avons recherché à caractériser ces réseaux dans un modèle incluant l'implication du microenvironnement dans la progression tumorale. De plus, il est considéré que des études conduites dans plusieurs de ces modèles sont plus pertinentes d'un point de vue biologique, puisque ces dernières permettent de s'affranchir des biais intrinsèques liés aux différents modèles (Vargo-Gogola and Rosen, 2007). Dans le contexte du cancer du sein, les injections orthotopiques de cellules cancéreuses dans le tissu adipeux de la glande mammaire de souris immuno-déficientes constitue l'un des modèles les plus représentatifs et les plus utilisés dans la littérature (Byrne et al., 2017; Vargo-Gogola and Rosen, 2007).

3.2.1. Mise au point du modèle de progression tumorale *in vivo*

Nous avons premièrement voulu appliquer un protocole de formation de tumeurs primaires et de métastases par les lignées de cancer du sein HER2+ HCC1954 exprimant de façon stable les transgènes 3xFLAG-GRB2 et -GFP décrites au chapitre précédent (Fig. 2.1). Le premier test d'injection a été effectué en vue (i) de déterminer la quantité optimale de cellules injectées, (ii) de déterminer si l'injection des cellules dans du Matrigel® améliore la proportion des tumeurs primaires formées ainsi que leur structure histologique, et (iii) d'extraire des cellules des tumeurs primaires pour les remettre en culture. En effet, il est décrit qu'un cycle de sélection des cellules d'intérêt *in vivo* dans ce type de protocole améliore le rendement de formation de tumeurs après la xénogreffé (Cariati et al., 2011). Par ailleurs, il a été démontré que l'utilisation de Matrigel® comme véhicule d'injection permet dans certains cas d'augmenter la pénétrance ainsi que de diminuer la nécrose à l'intérieur de la masse tumorale (DAI et al., 2015; Mullen, 2004). Différentes solutions cellulaires ont donc été injectées dans le tissu adipeux de la glande mammaire à puberté de souris CD1 immuno-déficientes agées de dix à douze semaines.

Lors du suivi de ces injections orthotopiques, quatre types de cas ont été observés (Fig. 3.3A). En effet, certaines des injections n'ont pas conduit à l'établissement de tumeurs palpables ou visibles (cas 1). D'autres injections ont conduit à l'établissement de tumeurs de petite taille (< 0.01 cm³, cas 2) ou de taille modérée (entre 0.01 et 1 cm³, cas 3). Enfin, certaines injections ont induit la formation de tumeurs dont le volume est compris entre 1 et 2 cm³ (cas 4). Ces souris ont été sacrifiées avant que la tumeur n'atteigne 2 cm³, en respectant les règles d'éthique institutionnelles.

La pénétrance de formation de tumeurs mammaires primaires de plus de 1 cm³ a été déterminée pour chaque condition (Fig. 3.3B). Les injections en PBS de cellules exprimant le transgène contrôle, 3xFLAG-GFP, n'ont pas conduit à l'établissement de tumeurs primaires, indépendamment du nombre de cellules injectées. Les injections véhiculées par du PBS de 1 ou 5 millions de cellules exprimant le transgène 3xFLAG-GRB2 ont conduit à la formation de tumeurs de taille modérée dans 33.3% et 25% des cas respectivement. Les deux quantités de cellules testées dans cette expérience permettent ainsi l'établissement de tumeurs primaires dans des proportions faibles mais similaires, suggérant que les deux

conditions testées pour ce paramètre influent peu sur la pénétrance. Les injections véhiculées par du Matrigel® de cellules exprimant l'une ou l'autre des constructions FLAG ont conduit à la formation de tumeurs de plus de 1 cm³ dans 50% des cas. Ces résultats suggèrent que l'utilisation du Matrigel® comme véhicule d'injection améliore très faiblement la pénétrance des xénogreffes. Cependant, toutes les tumeurs de volume supérieur à 1 cm³ extraites dans cette expérience présentaient un fort degré de nécrose, indépendamment du véhicule d'injection (PBS ou Matrigel®, données non montrées). Ceci suggère que le Matrigel® ne contribue pas à l'amélioration de l'aspect histologique des tumeurs mammaires établies dans notre cas, notamment quant à la présence de zones nécrotiques à l'intérieur de la tumeur.

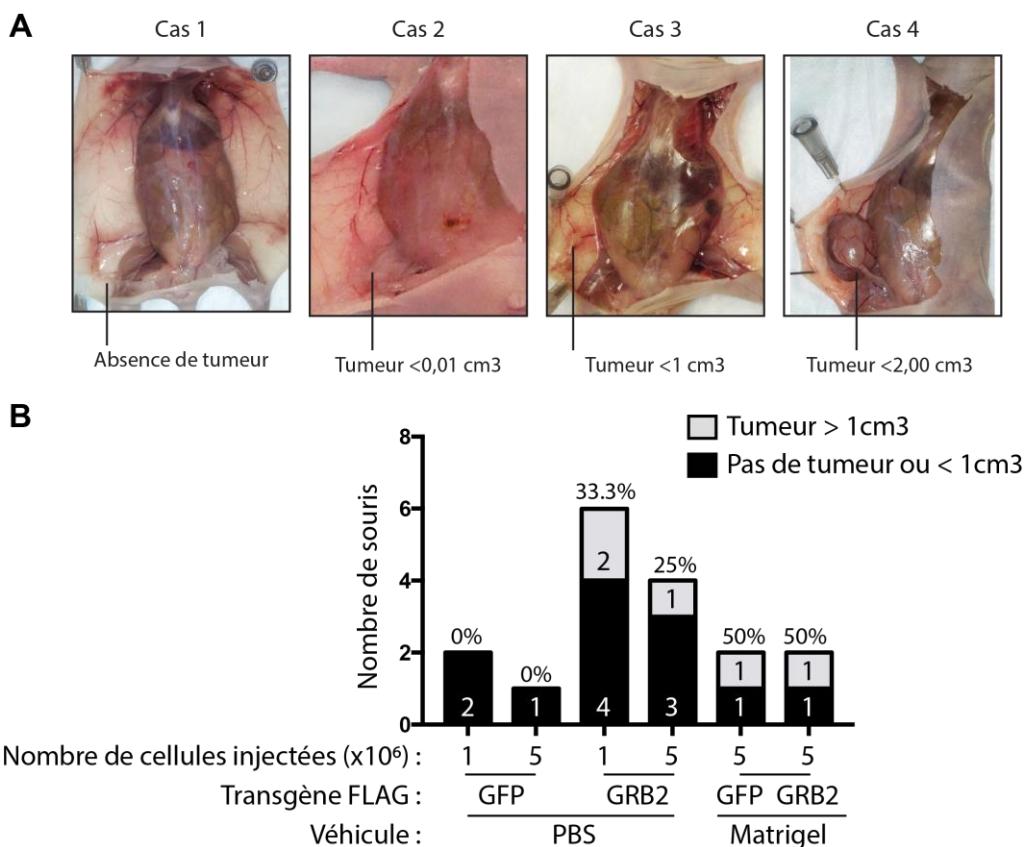


Figure 3.3 : Analyse de la pénétrance des xénogreffes orthotopiques de cellules HCC1954 chez des souris immuno-déficientes.

Des cellules HCC1954 exprimant de façon stable 3xFLAG-GFP ou 3xFLAG-GRB2 diluées dans du PBS ou du Matrigel® ont été injectées à différentes concentrations dans la glande mammaire de souris immuno-déficientes. A- Photographies représentatives des différents cas observés dans cette étude. B- Histogramme représentant le nombre de souris ayant développé ou non une tumeur de plus d'1 cm³ dans chaque condition testée. La pénétrance pour chaque condition testée est indiquée au-dessus de la colonne de l'histogramme.

Certaines des tumeurs issues de cette expérience ont été remises en culture. Les lignées ainsi extraites avec succès ont été analysées par Western blot et immunofluorescence. Ainsi que représenté sur la figure 3.4A, le niveau d'expression du transgène pour la première lignée explantée avec succès (lignée #1) est identique à celui de la lignée injectée (parentale), tandis que celui de la seconde lignée explantée (lignée #2) est inférieur à celui de la lignée injectée (parentale). Cependant, la lignée #2 a été sélectionnée pour le deuxième cycle d'injection en raison de sa capacité de prolifération (temps de doublement) très similaire à la lignée injectée, ce qui a permis sa caractérisation rapide. Les lignées stables utilisées ici sont maintenues sous sélection par la puromycine en culture, mais cette sélection a été interrompue lors de l'établissement des tumeurs primaires chez la souris. Ceci pourrait donc conduire à la perte de l'expression des transgènes dans une fraction des cellules de la tumeur ainsi formée, expliquant alors la diminution de l'expression du transgène dans la lignée #2. L'expression de la protéine de fusion 3xFLAG-GRB2 dans ces deux lignées a donc également été analysée par immunofluorescence (Fig. 3.5A). Ces images montrent que la population cellulaire dans chacune des deux lignées présente un niveau homogène d'expression de la protéine étiquetée FLAG.

Une nouvelle série d'injections orthotopiques a été réalisée, avec pour objectifs (i) de comparer les capacités à former des tumeurs primaires de la lignée parentale et de la lignée #2, (ii) d'obtenir des lignées explantées exprimant le transgène 3xFLAG-GFP. Ces xénogreffes ont été réalisées en injectant dans la glande mammaire 1×10^6 cellules des lignées parentales exprimant 3xFLAG-GFP ou -GRB2, ou de la lignée explantée #2, en utilisant le PBS comme véhicule. En raison de la faible pénétrance des xénogreffes de la première série d'injections, nous avons utilisé pour cette nouvelle expérience des souris immunodéficientes pubères d'âge inférieur (10-12 semaines dans la première série de xénogreffes, contre 7-9 semaines dans la seconde). En effet, il a été établi que certaines lignées dont les capacités à former des tumeurs primaires dans la glande mammaire de souris immuno-déficientes sont faibles présentent une pénétrance supérieure chez des souris d'âge inférieur (Cariati et al., 2011).

Toutes les souris dans cette seconde série d'injection ont développé une tumeur de volume supérieur à 1 cm^3 , indépendamment de la lignée injectée. La lignée #2 ne semble donc pas présenter une meilleure capacité à former des tumeurs dans la glande mammaire que la lignée

parentale. Ceci suggère que la xénogreffe orthotopique des cellules HCC1954 chez des souris immuno-déficientes d'âge inférieur est plus efficace. Des tumeurs issues de l'injection des lignées parentales GFP ou GRB2 ont été extraites et remises en culture après dissection. Les tumeurs issues de l'injection de la lignée explantée #2 n'ont pas été remises en culture, les lignées explantées ont donc subi un seul cycle de sélection *in vivo*. Les lignées remises en culture avec succès, les lignées #2.8 (GFP), #2.2, #2.9 et #2.10 (GRB2), ont été analysées par Western blot (Fig. 3.4A). Les lignées explantées exprimant le transgène GRB2 dans cette série d'injection présentent toutes un niveau d'expression du transgène inférieur à la lignée injectée (lignée parentale). Le niveau d'expression du transgène GFP de la lignée explantée #2.8 présente un niveau d'expression du transgène comparable à la lignée parentale exprimant le transgène 3xFLAG-GRB2 (figure 3.4A).

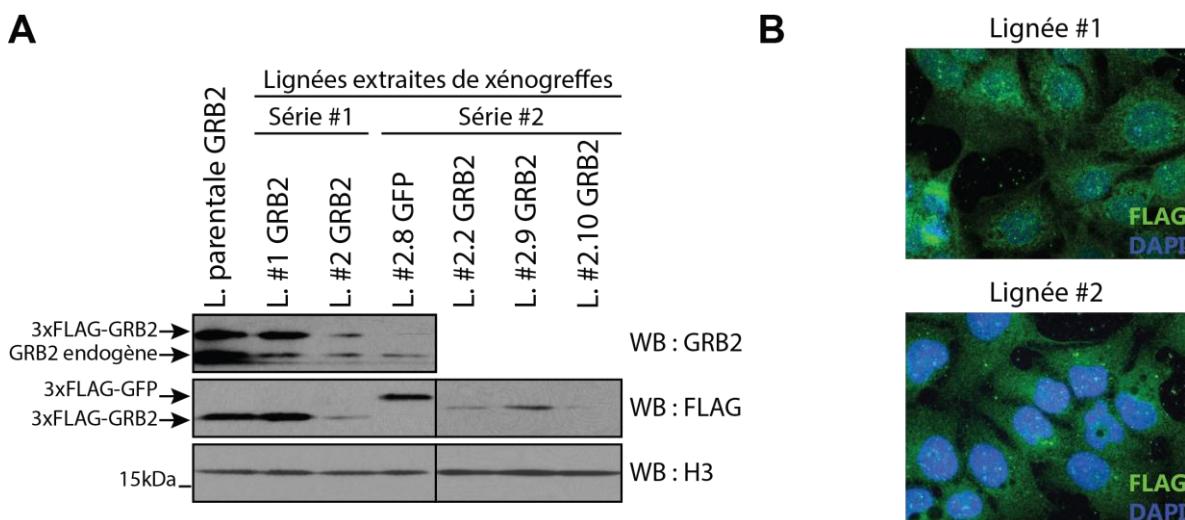


Figure 3.4 : Les lignées extraites des tumeurs mammaires formées par xénogreffes orthotopiques chez la souris immuno-déficiente présentent des niveaux d'expression des transgènes hétérogènes.

Les animaux ont été sacrifiés, et les tumeurs primaires disséquées puis homogénéisées. Les solutions obtenues ont été filtrées à la seringue pour désagréger les amas cellulaires, et les solutions cellulaires résultantes ont été cultivées en présence de puromycine. A- Les lysats des lignées extraites ou explantées ont été analysés par Western blot avec les anticorps indiqués. Les deux sections présentées sont issues de l'exposition unique de la même membrane, et sont séparées par des puits qui ne sont pas présentés par souci de clarté. B- Les cellules des lignées explantées #1 et #2 ont été fixées, puis analysées par immunofluorescence dirigée contre l'épitope FLAG.

3.2.2. Analyse protéomique des modulations dans les réseaux de GRB2 après xénogreffes orthotopiques chez la souris

Nous avons cherché à identifier les changements dans les interactions de GRB2 dans les lignées extraites des tumeurs. Pour cela, nous avons utilisé la lignée explantée #2.8 comme contrôle GFP, que nous avons comparé à la lignée parentale injectée ainsi qu'aux cellules explantées des lignées #1 et #2. En effet, la lignée #1 présente un niveau d'expression du transgène FLAG très proche de la lignée injectée, rendant ainsi la comparaison des interactions de GRB2 dans ces deux lignées plus rigoureuse (Fig. 3.5A). La lignée #2 présente quant à elle un niveau d'expression du transgène 3xFLAG-GRB2 inférieur à ces deux lignées (Fig. 3.5A), mais il nous paraissait judicieux de réaliser cette étude dans des lignées issues de plusieurs tumeurs afin de consolider la pertinence biologique de nos résultats. Par ailleurs, nous avons inclus dans ces expériences un contrôle supplémentaire, consistant à la purification du mélange de tous les lysats des lignées exprimant la protéine 3xFLAG-GRB2 sur des billes non couplées à l'anticorps dirigé contre le 3xFLAG. Dans l'éventualité où une protéine serait exprimée de façon importante dans une de ces lignées, mais pas dans la lignée contrôle 3xFLAG-GFP, cette potentielle protéine pourrait être purifiée de façon non spécifique préférentiellement dans une des lignées analysées. Ce contrôle nous permet de nous affranchir de ce biais, en identifiant les interactions non spécifiques.

Les cellules dans ces expériences n'ont pas été soumises à l'inhibition des tyrosine phosphatases par le Pervanadate, afin de maximiser les différences éventuelles entre les réseaux de signalisation dépendants de la phosphorylation dans ces lignées. Les résultats ont été analysés via des analyses statistiques par l'algorithme SAINT et sont représentés en graphique de ressemblance (Fig. 3.5B), tel que précédemment. De façon intéressante, ces analyses ont permis de valider 10 partenaires de GRB2 qui ne sont pas identifiés dans la lignée parentale (lignée injectée). En effet, cinq partenaires ont été caractérisés dans les purifications des interacteurs de GRB2 dans chaque lignée explantée : SFN (14-3-3 σ), VAPA, WIPF2, MVP et YWHAQ (14-3-3 θ) dans la lignée #1, et MISP, PCBP2, LMO7, TUBB3 et KRT7 dans la lignée #2.

Dans la lignée #1, deux de ces partenaires, WIPF2 et YWHAQ ont également été identifiés dans les réseaux de GRB2 de la lignée parentale après traitement au PV exclusivement (Fig. 2.1C), et VAPA a également été identifié dans les cellules traitées à l'EGF (Fig. 3.2D). De plus, WIPF2 et YWHAQ sont des interacteurs connus de GRB2, dépendants de l'inhibition des tyrosine phosphatases par le PV par exemple (Bisson et al., 2011). Leur présence dans les réseaux de GRB2 en absence de stimulation ou d'inhibition des phosphatases dans cette lignée extraite de tumeur suggère ainsi que les réseaux de signalisation de GRB2 ont subi des modifications favorisant la phosphorylation soutenue de certains acteurs de ces réseaux.

Les sept autres partenaires de GRB2 ainsi mis en évidence ne sont pas recensés dans la littérature comme partenaires de liaison de GRB2. On retrouve par exemple MVP et SFN dans la lignée #1, ainsi que LMO7 et MISP dans la lignée #2. De façon intéressante, la protéine SFN (14-3-3 σ) qui n'est pas décrite dans la littérature comme interacteur de GRB2, a été identifiée dans le sous-chapitre 3.1.2 comme partenaire exclusif de GRB2 dans des cellules de cancer du sein HER2+ de type mésenchymateux, est ici retrouvée dans les réseaux de la protéine adaptatrice uniquement dans la lignée #1.

De plus, ces analyses soulignent des modulations de certaines interactions de GRB2 dans les lignées explantées. Par exemple, les protéines GAREM, PTPRA, DNM2 et CBLB montrent une interaction avec GRB2 fortement diminuée dans les deux lignées explantées comparativement à la lignée parentale (Fig. 3.5C). Ces résultats suggèrent donc que les réseaux de GRB2 sont effectivement modifiés après sélection des cellules tumorales *in vivo*.

Afin de valider une partie de nos résultats par une méthode orthogonale, nous avons réalisé des expériences d'AP FLAG sur les lignées explantées #1, #2 et #2.8 (GFP) ainsi que sur la lignée parentale. L'interaction de GRB2 avec la DNM2 dans ces lignées a été analysée par Western blot (Fig. 3.5D). Les niveaux d'expression de la DNM2 semblent diminués dans les lignées explantées (#1, #2 et #2.8) comparativement à la lignée parentale (Fig. 3.5D). Les niveaux d'interaction de GRB2 avec la DNM2 ne présentent cependant pas de différence dans les différentes lignées analysées, contrairement aux observations obtenues dans l'étude d'AP-MS.

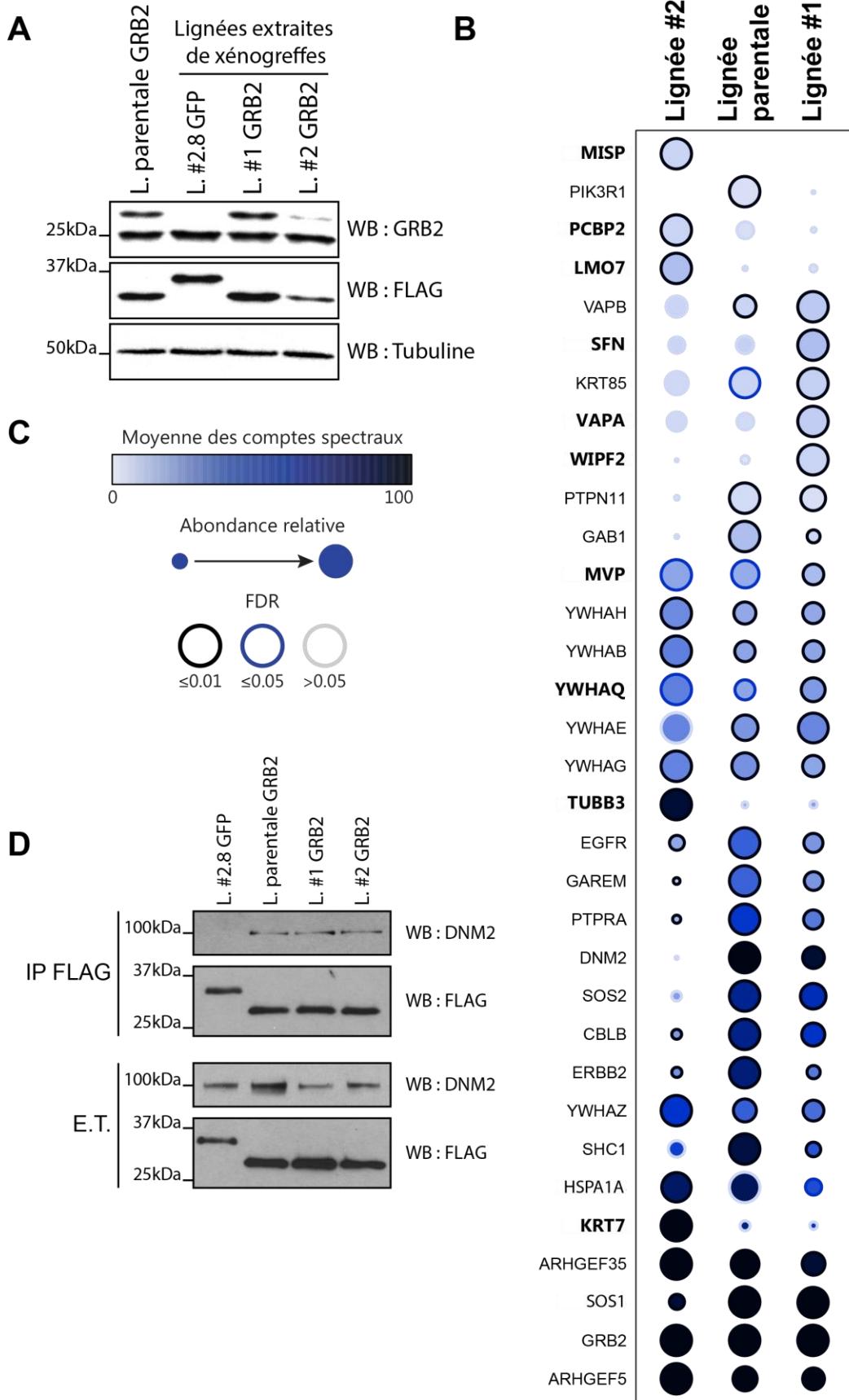


Figure 3.5 : Les interactions de GRB2 dans les deux lignées extraites de tumeurs établies chez la souris sont modifiées comparativement à la lignée injectée.

Les lignées explantées #2.8 (GFP), #1, #2, et la lignée parentale (GRB2), non stimulées et non traitées, ont été lysées. Des expériences d'AP-MS ont été réalisées en triplicat sur les lysats. A- Les niveaux d'expression des transgènes ont été vérifiés par Western blot. B- Les résultats d'AP-MS ont été analysés par l'algorithme SAINT et représentés sous forme de graphique de ressemblance grâce à l'outil Dot plot generator de ProHits-viz (Knight et al., 2017). C- Légende visuelle du graphique de ressemblance présenté en B. Chaque interaction proie/cible est représentée par un cercle. La couleur du pourtour du cercle correspond à la probabilité statistique de l'interaction, la taille du cercle reflète le ratio d'enrichissement relatif dans les complexes de GRB2 d'un interacteur donné dans chaque condition expérimentale. Enfin, la couleur intérieure du cercle représente l'abondance relative de l'interaction comparativement à l'abondance de toutes les interactions identifiées. D- Des expériences d'AP (IP FLAG) ont été réalisées sur les cellules des mêmes lignées, puis analysées en même temps que les extraits totaux (E.T.) par Western blot avec les anticorps indiqués.

3.3. Discussion

Les analyses présentées ici ont permis de mettre en évidence des modifications dans les réseaux d'interaction de GRB2 dans deux modèles de progression tumorale complémentaires. Ces résultats appuient donc notre hypothèse de travail initiale.

Nous avons notamment caractérisé une nouvelle interaction non recensée dans la littérature entre GRB2 et la protéine SFN. Cette liaison est observée exclusivement dans la lignée explantée #1 et dans les cellules de type mésenchymateux après traitement au TGF β . Ces résultats démontrent que les réseaux de GRB2 incluent effectivement de nouveaux partenaires après progression tumorale, dans nos deux modèles. De plus, SFN est connue pour interagir avec ERRFI1 (Benzinger et al., 2005), l'un des autres partenaires de GRB2 exclusif aux cellules présentant un phénotype mésenchymateux. Ceci suggère que les nouveaux partenaires de GRB2 identifiés dans nos modèles de progression tumorale pourraient appartenir à des complexes de signalisation pré-établis. L'expression de SFN est induite par p53 après dommages à l'ADN, et elle représente un inhibiteur majeur du cycle cellulaire (Hermeking et al., 1997). Une diminution de son expression par régulation épigénétique a de plus été mise en évidence dans de nombreux cancers, majoritairement dans les cancers du sein et de la prostate (Lodygin and Hermeking, 2005). Par exemple, une expression réduite de SFN corrèle avec des formes avancées de cancer ovarien (Akahira et al., 2004). SFN a ainsi été proposée par de nombreuses études comme suppresseur de tumeur

(Ko et al., 2014). Cependant, des études plus récentes ont également souligné l'expression de SFN en tant que facteur de mauvais pronostic, notamment dans le cancer du sein, pour lequel un brevet concernant la détection de SFN en tant qu'outil pronostic a été déposé (Boudreau and Bissell, 2010; Ko et al., 2014; Shiba-Ishii et al., 2015). Bien qu'il ait été démontré dans le cancer du poumon que SFN favorise la prolifération cellulaire, la formation de tumeur primaire et le processus métastatique *in vivo*, les mécanismes soutenant les fonctions pro-oncogéniques de cette dernière demeurent très peu documentés (Shiba-Ishii et al., 2015). Compte tenu de son association exclusive à GRB2 dans nos deux modèles de progression tumorale, nous proposons que l'interaction de ces deux protéines puisse participer à la progression tumorale. Ces observations offrent ainsi de nouvelles possibilités de recherche pour éclaircir le rôle de SFN dans l'oncogenèse.

Par ailleurs, l'analyse de l'intensité des interacteurs de GRB2 dans les purifications TGF β + a mis en évidence des variations dans l'intensité d'interaction de GRB2 avec certains de ses partenaires. Notamment, ces résultats ont souligné une diminution d'interaction importante de GRB2 avec DNM2, FRS2 et CRKL lors de la transition induite par le TGF β . Il est intéressant de noter que ces derniers sont suggérés être impliqués dans le processus métastatique et la progression tumorale du cancer du sein notamment (Chafik, 2015; Dey et al., 2010; Issa et al., 2013; Lee et al., 2010; Totta et al., 2016; Zhao et al., 2013). Alors que FRS2 et CRKL semblent favoriser le processus métastatique, de faibles niveaux de DNM2 corrèlent avec des formes invasives et métastatiques du cancer de l'utérus, suggérant que son interaction avec GRB2, diminuée lors de la transition de type épithélio-mésenchymateuse, puisse participer à la régulation négative du processus métastatique (Lee et al., 2010). Ces résultats suggèrent ainsi que les interactions de GRB2 sont changées lors de la transition induite par le TGF β , et pourraient ainsi participer à l'acquisition du phénotype mésenchymateux.

Il est intéressant de noter que quatre partenaires de GRB2, GAREM, PTPRA, DNM2 et CBLB, voient leur association à cette dernière diminuée dans les deux modèles de progression tumorale étudiés ici. Ces résultats soutiennent donc fortement notre hypothèse de travail, selon laquelle les modifications des réseaux de GRB2 dans la progression tumorale du cancer du sein HER2+ pourraient soutenir la progression tumorale via l'assemblage de

complexes signalétiques spécifiques. Ces quatre interacteurs sont des partenaires de GRB2 bien connus et ont été décrits pour leur implication dans la signalisation oncogénique.

En effet, la protéine adaptatrice GAREM est impliquée dans l'activation dépendante de GRB2 et de PTPN11 de la kinase ERK, en aval d'EGFR notamment (Tashiro et al., 2009). Il a de plus été souligné que les niveaux d'expression de GAREM régulent la transformation cellulaire via la régulation de l'activité de ERK (Tashiro et al., 2009). L'implication de GAREM dans le processus métastatique ou la migration cellulaire n'est cependant pas décrite dans la littérature.

PTPRA est une phosphatase membranaire impliquée dans la promotion de la migration de cellules non mammaires de façon dépendante des intégrines et de GRB2 (Cheng et al., 2014). Il a cependant été montré que PTPRA régule négativement la migration cellulaire induite par HER2, suggérant un rôle positif ou négatif dans la migration selon le contexte cellulaire (Boivin et al., 2013).

La Dynamine 2 est quant à elle une GTPase impliquée notamment dans l'endocytose, la signalisation via la voie MAPK et la dynamique du cytosquelette d'actine (Sever, 2002). Bien que le rôle de son interaction avec GRB2 demeure peu documenté, son implication dans la migration cellulaire et la progression tumorale est très étudiée. Ainsi, il a été démontré que DNM2 favorise la migration de cellules de cancer du poumon, tandis que des niveaux réduits de son expression dans le cancer du col de l'utérus corrèlent avec des formes invasives et agressives (Lee et al., 2010; Yamada et al., 2016). Cette dernière semble donc présenter également des fonctions de régulation positive ou négative de la migration cellulaire et du processus métastatique dépendantes du contexte cellulaire.

À l'inverse, l'ubiquitine ligase CBLB est décrite dans la littérature uniquement comme régulateur négatif de la migration dans le cancer du sein, via son contrôle de l'internalisation GRB2-dépendante de nombreux RTK tels qu'EGFR (Vennin et al., 2015; Zhang et al., 2015). La perte d'interaction de cette dernière avec GRB2, connue pour entraver son recrutement à différents RTK tels qu'EGFR et de ce fait l'internalisation et la régulation négative de ces derniers, pourrait ainsi être à l'origine de la promotion de l'invasion et du processus métastatique (Fortian and Sorkin, 2014; Huang and Sorkin, 2005; Zhang et al., 2015).

Au vu des résultats présentés ici et de la littérature, nous proposons que l'association de GRB2 à DNM2 et PTPRA participe à la régulation de leurs fonctions dans la migration en

fonction du contexte cellulaire. L’association de GRB2 avec ces partenaires dans un micromilieu réprimant la progression tumorale pourrait promouvoir les fonctions anti-migratoires de DNM2 et PTPRA. À l’inverse, la perte de cette interaction dans un microenvironnement permissif à l’oncogenèse faciliterait leur activité de promotion de la migration et de l’invasion cellulaire.

L’un des points soulevés par ces travaux repose en la nette diminution de la liaison d’un nombre important de régulateurs positifs de la signalisation pro-tumorale par les récepteurs de famille HER, tels que GAREM et CRKL dans le modèle de transition épithélio-mésenchymateuse *in vitro*, ainsi que HER2, EGFR, PIK3R1, PTPN11, GAB1, GAREM, et SOS2 dans les deux lignées explantées de tumeurs établies chez la souris. De plus, certains des partenaires de GRB2 caractérisés après traitement au TGF β , tels que ERRFI1, sont impliqués dans la régulation négative de la signalisation en aval de ces récepteurs (Anastasi et al., 2003). Ceci suggère que contrairement à ce que nous avions envisagé, l’association de GRB2 à ses partenaires des voies de signalisation pro-tumorales dépendantes de HER est globalement réduite dans nos deux modèles de progression tumorale. Cependant, on observe également une diminution de l’interaction de GRB2 avec les ubiquitine ligases CBL et CBLB dans nos modèles, une association notamment nécessaire à l’internalisation d’EGFR (Huang and Sorkin, 2005). Par ailleurs, plusieurs partenaires de GRB2 mis en évidence dans les lignées extraites de tumeurs, tels MVP et SFN dans la lignée #1, et LMO7 et MISP dans la lignée #2, ont été impliquées dans la dynamique du cytosquelette, la migration cellulaire et/ou le processus métastatique de différents cancers, dont le cancer du sein (Hu et al., 2011; Kumeta et al., 2014; Loetsch et al., 2013; Maier et al., 2013; Shiba-Ishii et al., 2015). Nous proposons donc que la progression tumorale du cancer du sein HER2+ s’accompagne d’une modulation active de la signalisation pro-tumorale par les récepteurs HER. Les réseaux de GRB2 seraient réorientés de leur état basal pro-prolifératif soutenant positivement la signalisation induite par les récepteurs HER pour un état pro-migratoire démontrant une dépendance réduite à la signalisation par les récepteurs HER.

Afin de consolider nos observations, il serait primordial de quantifier de façon absolue les modulations mises en évidence par ces travaux. En effet, tel qu’exemplifié par la figure 3.5D, la validation des modifications observées par Western blot ne constitue pas une stratégie intéressante, en raison de la grande différence de sensibilité de cette technique avec les

analyses d'AP-MS. La stratégie d'AP-SWATH décrite récemment est une méthode d'identification et de quantification de protéines dans un mélange complexe très sensible et très robuste qui ne requiert pas d'hypothèse initiale (Findlay et al., 2013; Gillet et al., 2012; Lambert et al., 2013). Cette méthode permettrait donc d'une part de quantifier de façon très fiable et absolue les modulations d'interaction observées dans nos modèles et d'autre part de caractériser plus en profondeur ces variations dans les modèles présentés ici. Cette technique permettrait également de caractériser les réseaux d'interactions de GRB2 dans les tumeurs établies chez la souris sans phase d'expansion *in vitro*, grâce à sa grande sensibilité.

L'analyse quantitative de différentes lignées de cancer du sein HER2+ ou HER2- en tirant profit des modèles décrits dans ce chapitre, ainsi qu'un criblage fonctionnel des partenaires mis en évidence constituent deux aspects essentiels de la poursuite de ces travaux. L'extension de ces analyses dans un panel de lignées de cancer du sein HER2+ permettrait effectivement la différenciation de variations dans les réseaux de GRB2 spécifiques et communes aux modèles cellulaires étudiés. L'inclusion de lignées de cancer mammaire HER2- dans ces travaux pourrait en sus amener de nouvelles informations quant à l'implication de la signalisation de HER2 dans les modulations des interactions de GRB2 observées dans ces travaux. Par ailleurs, la déplétion de chaque partenaire avant traitement au TGF β pour évaluer le rôle de ceux-ci dans l'acquisition de propriétés mésenchymateuses par les cellules cancéreuses mammaires HER2+ semble représenter un outil robuste pour sélectionner *in vitro* des candidats pour l'étude des déterminants moléculaires de leur association à GRB2 et de l'implication de cette interaction dans la progression tumorale.

En sus, les différences d'interactions observées ici pourraient être la conséquence d'une régulation de l'expression des partenaires de GRB2 lors de la modélisation de la progression tumorale tout comme d'une régulation de leur interaction avec la protéine adaptatrice. Par exemple, il a été démontré que la signalisation induite par le TGF β durant la transition épithélio-mésenchymateuse augmente l'expression de ERRFI1, l'un des interacteurs de GRB2 identifiés exclusivement après traitement au TGF β (Izumchenko et al., 2014). Pour approfondir la caractérisation des interactions identifiées par ces expériences, il serait ainsi essentiel d'inclure les extraits totaux aux quantifications, afin de différencier les partenaires de GRB2 dont les niveaux d'expression sont altérés de ceux dont l'interaction à la protéine

adaptatrice est régulée dans nos modèles. Ces données permettraient d'éclaircir la mécanistique des modulations observées dans nos expériences.

Par ailleurs, il est proposé dans la littérature que les niveaux d'expression de GRB2 régulent la stœchiométrie de dimérisation de cette dernière, modulant de ce fait les interactions de la protéine adaptatrice avec ses partenaires (Lin et al., 2012). Il a de plus été suggéré que la dimérisation de cette protéine adaptatrice régule ses interactions, modulant ainsi la signalisation physiologique et pro-tumorale régulée par GRB2 (Ahmed et al., 2015). Cependant, des données du laboratoire ont permis de souligner que des variations importantes des niveaux d'expression du transgène 3xFLAG-GRB2 dans des cellules HEK293T ne perturbent pas les interactions de cette dernière dans des expériences d'AP-MS similaires à celles présentées ici (Bisson et al., données non publiées). Toutefois, il apparaît prudent d'établir des lignées exprimant une version étiquetée de GRB2 endogène via la récente technique de CRISPR, afin de s'affranchir de cet éventuel biais (Ratz et al., 2015).

En conclusion, ces résultats apportent une preuve de concept importante, validant ainsi notre hypothèse initiale postulant que les réseaux de GRB2 sont modulés lors de la progression tumorale. De nombreuses évidences suggèrent effectivement un détournement des réseaux de signalisation cellulaire par les cellules cancéreuses (Pawson and Warner, 2007). Nos travaux proposent pour la première fois une évidence de la variation des interactions de la protéine adaptatrice GRB2 dans ce processus, suggérant ainsi l'implication de certaines de ces interactions dans la progression tumorale et illustrant le rôle central de cette protéine adaptatrice dans le processus oncogénique du cancer du sein HER2+ (Dankort et al., 1997; Xie et al., 1995). Bien que les résultats présentés ici soient exclusivement descriptifs et que leur consolidation soit nécessaire, ces derniers constituent un premier pas vers la caractérisation extensive des interactions de GRB2 dans le cancer du sein HER2+. Nous envisageons que ces analyses apporteront des informations précieuses quant aux mécanismes régulant le processus oncogénique mammaire induit par HER2, et permettront éventuellement d'améliorer les outils prédictifs et pronostics disponibles dans le cadre de la médecine personnalisée.

3.4. Matériel et méthodes

3.4.1. Constructions

Les séquences codantes de GRB2 humain (NCBI clone NM_002086) ont été clonées en aval de l'épitope 3xFLAG (Sigma Aldrich) dans le vecteur pMSCVpuro (Clontech). Les inserts ont été séquencés en entier, et l'expression des transgènes a été vérifiée par Western blot.

3.4.2. Culture cellulaire

Les cellules HCC1954 (ATCC) ont été cultivées dans du RPMI (Wisent) complémenté par 10% de sérum de veau fœtal (Wisent) à 37°C dans une atmosphère humide contenant 5% de CO₂ selon les recommandations du fabricant. Les cellules ont été transfectées via nucléofection par l'AMAXA 4D (Lonza). Les cellules ayant intégré le plasmide ont été sélectionnées par 0.75 µg/mL de puromycine pendant deux semaines. Des clones isolés ont été piqués et sélectionnés selon leur niveau d'expression de transgène.

3.4.3. Traitement au TGFβ

Les cellules HCC1954 ont été rincées au PBS, resuspendues par traitement à la trypsine-EDTA 0.25% (Gibco), puis homogénéisées dans du milieu de culture complet. Les solutions cellulaires ont été traitées avec 2ng/mL de TGFβ1 (Peprotech) ou de véhicule (0.4mM HCl), avant d'être ensemencées à une densité de 15x10³ cellules par cm², dans du milieu complet contenant 2 ng/mL de TGFβ1 ou de véhicule. Après adhésion, le milieu a été changé pour du milieu dépourvu de sérum, contenant 2ng/mL de TGFβ1, ou l'équivalent volumique de véhicule. Ce milieu a été renouvelé 24h après la privation en sérum. Les cellules ont été lysées ou fixées après 48h de traitement.

3.4.4. Xénogreffes chez la souris

Les lignées stables HCC1954 3xFLAG-GRB2 ou -GFP ont été rincées au PBS, resuspendues dans de la trypsine EDTA 0.25% (Gibco) pendant 5 minutes. La trypsine a été inhibée par ajout de milieu contenant 10% de sérum, et les cellules ont été culottées par centrifugation. Les culots cellulaires ont alors été lavés 2 fois au PBS, puis resuspendus dans du PBS. Ces solutions cellulaires en PBS ont été injectées dans le tissu adipeux de la 4^{ème} glande mammaire droite de souris CD1 nu/nu (086, Charles River) femelles âgées de 7 à 12 semaines. Les souris ont été sacrifiées après développement de tumeurs entre 1 cm³ et 2 cm³ ou 3 mois après les injections. Le protocole expérimental a été approuvé par le comité d'éthique du CHUQ et de l'Université Laval.

3.4.5. Établissement de lignées cellulaires à partir de tumeurs primaires chez la souris

Les tumeurs mammaires disséquées ont été lavées en PBS, puis découpées au scalpel. Les tumeurs ont alors été incubées à 37°C avec agitation avec de la collagénase/dispase (0.1u/mL, 0.8U/mL, Roche) pendant 30 minutes, puis avec de la trypsine-EDTA 0.025% (Gibco) pendant 15 minutes. Les solutions ont été forcées à travers une aiguille. Les solutions de cellules isolées ont été ensemencées et maintenues en culture dans le milieu de sélection des lignées stables supplémenté par 5% d'une solution d'antibiotiques et d'anti-mycotiques (Sigma-Aldrich).

3.4.6. Immunopurifications

Les immunopurifications ont été réalisées selon le protocole décrit précédemment (Beigbeder et al., 2016). Brièvement, les cellules à la confluence déterminée par le traitement ou bien à 95% de confluence ont été lavées avec du PBS à 4°C. Les protéines ont été extraites par raclage en présence de tampon de lyse contenant des inhibiteurs de protéases et de phosphatases à 4°C. Les lysats ont été centrifugés à 20 000 g pendant 20 minutes puis normalisés selon leur concentration protéique, déterminée selon le protocole de Lowry. Les

lysats ont alors été incubés avec la résine d'affinité M2 (Sigma Aldrich) ou la résine de sépharose CL-4B (Sigma-Aldrich) pendant 1h30 à 4°C. Après incubation, les billes ont été lavées trois fois avec du tampon de lyse contenant des inhibiteurs de protéases et phosphatases. Pour les analyses en Western blot, les billes ont été resuspendues dans du tampon de charge Laemmli. Pour les analyses en MS, les billes ont été lavées deux fois supplémentaires dans du tampon Tris 20 mM pH 7.4. Les protéines immuno-purifiées ont alors été éluées par trois incubations de 10 minutes avec agitation dans 50 mM d'acide phosphorique à 4°C.

3.4.7. Western blot et anticorps

Les cellules ont été rincées au PBS puis lysées en tampon Laemmli. La concentration protéique a été établie par dosage Lowry. Les échantillons ont été séparés sur gel de polyacrylamide 8-15%. Les protéines ont été transférées sur membrane de nitrocellulose 0.45 µm (BioRad). Les membranes ont été bloquées dans du TBS 5% lait pendant 1h à température pièce, puis lavées au TBS. Les membranes ont été incubées sur la nuit à 4°C avec les anticorps primaires suivants, dilués dans du TBS-T contenant 1% de lait ou 5% de BSA dépendamment des recommandations du fabricant : vimentine (Sigma-Aldrich), pERK (Cell Signaling Technology), ERK (Cell Signaling Technology), vinculine (Cell Signaling Technology), histone H3 (Cell Signaling Technology), GRB2 (BDBiosciences), tubuline (Cell Signaling Technology). Après lavages au TBS-T, les membranes ont été incubées 1 h à température ambiante avec les anticorps secondaires ou couplés suivants: anti IgG de souris-HRP (NEB), anti IgG de lapin-HRP (NEB), M2-HRP (Sigma-Aldrich). Après lavages au TBS-T, les membranes ont été incubées avec la solution Luminata Crescendo Western (EMD Millipore) avant révélation sur des films autoradiographiques Hyblot CL (Denville).

3.4.8 Immunofluorescence

Les cellules HCC1954 ont été ensemencées et traitées au TGFβ1 tel que décrit ci haut. Les cellules ont été fixées au méthanol pendant 3 minutes à -20°C puis lavées au PBS. Après un blocage de 1 h à température pièce dans du PBS contenant 10% de sérum normal de chèvre

(Wisent), les lamelles ont été incubées avec les anticorps primaires. L'anticorps anti-FLAG (Sigma-Aldrich) et anti-GRB2 (SantaCruz Biotechnologie) dilués dans la solution de blocage ont été incubés 2h à température ambiante et l'anticorps anti-vimentine (Sigma-Aldrich) dilué dans la solution de blocage pendant 1h30 à température pièce puis toute la nuit à 4°C en chambre humide. Après lavages au PBS, les lamelles ont été incubées avec les anticorps secondaires suivants dilués dans la solution de blocage pendant 1h à température ambiante : anti-IgG de souris couplé à l'Alexa Fluor 568 (Thermo Fisher Scientific) et anti-IgG de lapin couplé à l'Alexa Fluor 488 (Thermo Fisher Scientific). Après lavages au PBS, les lamelles ont été montées dans du milieu de montage contenant du DAPI (Prolong Gold antifade, Thermo). Les images ont été acquises par un microscope à épifluorescence Nikon Eclipse E600. Les images ont été analysées avec FIJI (NIH).

3.4.9. Analyses de spectrométrie de masse

Les échantillons de spectrométrie de masse ont été préparés tel que décrit précédemment (Beigbeder et al., 2016). Les analyses de MS ont été effectuées par un spectromètre 5600+ (Sciex) avec une source d'ionisation par électrospray, couplé à une nanocolonne de chromatographie liquide en phase inverse (Eksperter NanoLC425, Eksigent). Les peptides digérés ont été séparés sur une nanocolonne cHiPLC (3u, 120A C18, 15 cm x 0.075 mm de diamètre interne). Les peptides ont été élués par un gradient linéaire de 90 minutes de 5-35% de solvant B (acétonitrile, 0.1% acide formique) à 300 nL/min. Les spectres de masse ont été acquis par Analyst (version 1.7, Sciex) en mode dépendant des données. Chaque spectre entier (de 400 à 1250 m/z) a été suivi de la dissociation induite par collision des vingt ions parents les plus intenses. L'exclusion dynamique a été fixée pour une période de 12 secondes avec une tolérance de 100 ppm.

Les listes de pics MS/MS ont été générées via la version 5.0 de Protein Pilot (Sciex). Les fichiers MGF ont alors été analysés par Mascot (Matrix Science, UK, version 2.4.0) et X! Tandem (The GPM, thegpm.org; version CYCLONE (2010.12.01.1). Les deux logiciels ont été paramétrés pour chercher la banque de données Uniprot *Homo sapiens* reference proteome (mise à jour de Mars 2014, 69150 entrées) en modélisant une digestion par la trypsine. Les séquences protéiques des transgènes 3xFLAG-GFP et -GRB2 ont été ajoutées

à la banque de données afin d'estimer leur couverture. Les banques de données ont été cherchées avec une tolérance de masse de 0.6 Da pour les ions fils et 10 ppm pour les ions parents pour le sous-chapitre 3.1, et de 0.100 Da pour les ions fils et les ions parents pour la section 3.2. La carbamidométhylation des cystéines a été considérée comme modification fixe pour tous les échantillons. L'oxidation des méthionines et la phosphorylation des séries, thréonines et tyrosines ont été considérées comme des modifications variables pour tous les échantillons. Deux sites de coupures trypsiques manqués ont été autorisés. Le logiciel Scaffold (version 4.7.5, Proteome Software Inc.) a été utilisé pour valider les identifications peptidiques et protéiques basées sur les spectres MS/MS. L'identification des protéines a été acceptée lorsqu'elle était établie à une probabilité supérieure à 98% ou 99%, afin d'atteindre un taux de fausse découverte (FDR) inférieur à 1% et lorsque la protéine présentait minimalement un peptide identifié. Les probabilités d'identification protéique ont été déterminées par l'algorithme Protein Prophet (Nesvizhskii et al., 2003). Les protéines contenant des peptides similaires dont les spectres MS/MS ne permettaient pas la différenciation ont été groupées pour satisfaire les principes de parcimonie.

Les noms de gènes de chaque protéine validée et leurs comptes spectraux correspondants dans les échantillons de trois réplicats biologiques ont été exportés dans une matrice répondant aux paramètres de l'algorithme SAINT (Choi et al., 2012). Des analyses SAINT express des triplicats avec l'inclusion des contrôles GFP internes ou externes, ainsi que les contrôles de la banque de données CRAPome pour certains échantillons. Les protéines présentant un score SAINT supérieur à 0.9 ont été considérés comme de réels interacteurs. Les résultats bruts de l'analyse SAINT ont alors été utilisés pour construire les graphiques de ressemblance grâce à l'outil Dot plot generator de ProHits-viz, avec un FDR primaire de 0.01 et un FDR secondaire de 0.05.

4 Chapitre 4 : Discussion générale et conclusions

L'hypothèse de mon projet doctorat postulait que les réseaux d'interactions de GRB2 sont modifiés au cours de la progression tumorale du cancer du sein HER2+, soutenant par ces modifications la signalisation pro-tumorale dépendante de HER2. L'objectif général consistait à identifier puis à caractériser ces modifications dans différents modèles de cancers du sein HER2+. Nous avons mis en évidence des modifications dans les interactions de GRB2 dans des cellules de cancer du sein HER2+ ainsi que dans des modèles complémentaires de progression tumorale. Nous avons également décrit un nouveau complexe signalétique composé de MPZL1, PTPN11 et GRB2.

4.1 Les réseaux d'interaction de GRB2 présentent des modifications dans le cancer du sein HER2+

Pour tester notre hypothèse, nous avons tout d'abord cherché à identifier les interactions de GRB2 dans des cellules cancéreuses mammaires HER2+ (lignée HCC1954). Ces analyses ont permis d'identifier des modifications dans les réseaux de signalisation de GRB2, mais également sur la régulation d'interactions de GRB2 préalablement caractérisées.

4.1.1 Les réseaux signalétiques de GRB2 incluent six nouveaux partenaires dans des cellules de cancer du sein HER2+

Les fonctions de la protéine adaptatrice GRB2 dans la signalisation cellulaire, l'homéostasie et l'oncogenèse dépendent fortement de sa capacité à interagir avec différentes combinaisons de récepteurs et/ou d'effecteurs cytoplasmiques (Cheng et al., 1998; Pawson and Nash, 2003). De nombreuses études se sont donc attachées à caractériser les partenaires de cette protéine adaptatrice et la régulation de ces interactions depuis sa découverte (Bisson et al., 2011; Fortian and Sorkin, 2014; Galliher-Beckley and Schiemann, 2008; Schlaepfer et al., 1994; Skolnik et al., 1993). Notamment, deux approches à haut débit par spectrométrie de masse, plus récentes, ont caractérisé les partenaires de GRB2 dans différentes conditions,

et ont ainsi identifié respectivement 108 et 38 partenaires de GRB2 des cellules humaines (Bisson et al., 2011; Brehme et al., 2009). En utilisant une méthode similaire dans la lignée de cancer du sein HER2+ HCC1954, nous avons identifié plus de trente partenaires de GRB2 (chapitre 2).

Cinq de ces interacteurs, MPZL1, STAP2, ARHGEF35, VAPB, et PRKCD, n'étaient pas recensés dans la littérature comme partenaires de GRB2 et font l'objet de cette section. Ces derniers pourraient de ce fait appartenir à des complexes de signalisation spécifiques au contexte de suractivation de HER2 et ainsi participer à la signalisation pro-tumorale HER2-dépendante. La majorité de ces nouveaux interacteurs est par ailleurs décrite dans la littérature pour leur participation au processus tumorigénique.

Par exemple, la protéine kinase C δ (PRKCD) nouvellement identifiée comme partenaire de GRB2 dans nos travaux est une sérine/thréonine kinase impliquée dans la régulation de l'apoptose, favorisant ou inhibant cette dernière dépendamment du contexte cellulaire (Brodie and Blumberg, 2003). PRKCD est bien connue pour son rôle pro-apoptotique et anti-tumoral, sa déplétion induisant la transformation de certains types cellulaires, tandis que sa surexpression provoque l'arrêt du cycle cellulaire (Lu et al., 1997; Watanabe et al., 1992). De plus, une diminution de l'expression de cette kinase a été relevée dans différents cancers tels que celui de la vessie (D'Costa et al., 2005; Varga et al., 2004). Cependant, une surexpression de cette protéine a été observée dans différents cancers, notamment dans les cancers du sein de haut grade (McKiernan et al., 2008; Pongracz et al., 1995). Par ailleurs, il a été démontré que le niveau d'expression de PRKCD corrèle négativement avec le pronostic pour les patientes atteintes de cancer du sein HER2+ exclusivement. Cette même étude a également démontré que PRKCD interagit avec le récepteur HER2 et régule l'établissement d'un complexe signalétique incluant HER2, PRKCD et SRC, requis à la prolifération cellulaire HER2-dépendante et à l'établissement de tumeurs mammaires HER2+ dans des modèles murins (Allen-Petersen et al., 2014). L'interaction de GRB2 avec PRKCD observée ici pourrait ainsi être la conséquence de son association au récepteur HER2, lui-même lié à GRB2. Cependant, l'interaction entre PRKCD et HER2 n'ayant pas été montrée directe, GRB2 pourrait également être responsable du recrutement de la kinase au récepteur activé, et de ce fait des fonctions oncogéniques de cette kinase dans le cancer mammaire HER2+.

Un autre partenaire de GRB2 caractérisé par nos travaux, STAP2 (ou BKS pour *Breast tumor Kinase Substrate*), est impliqué dans la progression tumorale. Cette protéine est un partenaire et substrat de la kinase PTK6 ou BRK (pour *Breast tumor Kinase*), une tyrosine kinase impliquée dans la promotion de la prolifération et de la migration dépendantes des récepteurs de la famille HER dans le cancer du sein. La surexpression de cette kinase est très fréquente dans le cancer du sein et corrèle avec un mauvais pronostic (Barker et al., 1997; Harvey and Crompton, 2003; Mitchell et al., 2000; Ostrander et al., 2007). STAP2 a de plus été montrée nécessaire à l'activation de BRK en permettant son recrutement membranaire, ainsi qu'au recrutement de STAT3 et STAT5 qui présentent une fonction pro-proliférative en aval de BRK dans le cancer du sein (Ikeda et al., 2010, 2011). Il a par ailleurs été démontré que cette kinase interagit avec EGFR et HER3 et participe, lorsque surexprimée, à la signalisation pro-tumorale induite par les récepteurs HER (Kamalati et al., 1996, 2000). Cependant, l'association de BRK aux récepteurs de la famille HER n'a pas été démontrée directe, et l'identification dans nos travaux de STAP2 mais non de BRK dans les complexes de GRB2 suggère que l'interaction identifiée n'est probablement pas médiée par BRK. L'interaction de GRB2 avec STAP2 découverte dans les travaux présentés ici pourrait être la conséquence de la présence en association avec les récepteurs HER du complexe BRK-STAP2 ainsi que de GRB2 dans notre modèle de cancer du sein HER2+. Toutefois, GRB2 pourrait également médier le recrutement du complexe STAP2-BRK aux récepteurs de la famille HER, et ainsi réguler la fonction de ce complexe dans l'oncogenèse HER-dépendante.

Ces travaux ont également mis en évidence une nouvelle association entre la protéine VAPB et GRB2. De façon intéressante, la protéine VAPA a également été identifiée comme nouvel interacteur de GRB2 dans notre modèle *in vivo*. Les protéines VAPA et VAPB (ou VAMPA et VAMPB) sont les deux membres chez les mammifères de la famille des VAP (*VAMP Associated Proteins*) (Lev et al., 2008; Nishimura et al., 1999). Ces protéines transmembranaires du réticulum endoplasmique sont les principaux médiateurs des interactions protéiques entre le réticulum et les autres organelles cellulaires ou le cytosol. Le rôle de VAPA et VAPB dépend donc de leurs associations à différentes protéines, et une centaine de partenaires de ces protéines transmembranaires ont été caractérisés (Murphy and Levine, 2016). Ces dernières sont actives sous forme d'homo- ou d'hétéro-dimères, et sont impliquées dans la régulation de nombreux processus cellulaires tels que le trafic

membranaire ou l'organisation des microtubules (Lev et al., 2008; Nishimura et al., 1999). Par ailleurs, il a été décrit que VAPA est impliquée dans l'adhésion cellulaire. En effet, cette dernière régule l'adhésion cellulaire en contrôlant l'activité de la protéine membranaire ORP-3, qui favorise l'activation de la petite GTPase R-RAS, de l'intégrine β 1 et d'AKT (Weber-Boyat et al., 2015). Une autre étude a quant à elle décrit que la protéine VAPB participe à l'oncogenèse dépendant de HER2 (Rao et al., 2012). Il a été montré que cette protéine est fréquemment surexprimée dans les cancers du sein, et que son expression corrèle avec de mauvais facteurs pronostics (Rao et al., 2012). De plus, cette étude a démontré que la déplétion de VAPB entrave la prolifération et transformation de cellules épithéliales HER2+ *in vitro* et abolit la formation de tumeurs mammaires HER2+ *in vivo*, notamment via la régulation de l'activité d'AKT par VAPB (Rao et al., 2012). Bien que des interactions entre EGFR et VAPA d'une part, et HER2 et VAPB d'autre part aient été caractérisées par des approches à haut débit semblables à la technique adoptée dans nos travaux, le rôle de ces interactions et leurs déterminants moléculaires ne sont pas décrits dans la littérature (Foerster et al., 2013; Hein et al., 2015). Les nouvelles associations décrites dans nos travaux entre GRB2 et VAPA et VAPB pourraient ainsi être responsables du recrutement de ces dernières aux récepteurs de la famille HER dans le cancer du sein HER2+, et ainsi des fonctions oncogéniques de VAPB dans ce contexte. La caractérisation de ces deux interactions, de leurs déterminants moléculaires et de leur implication dans la signalisation oncogénique dépendante des récepteurs HER dans le cancer mammaire HER2+ pourrait ainsi apporter des informations précieuses sur la régulation de ces voies de signalisation, et leur implication dans la signalisation pro-tumorale de HER2.

Un autre partenaire de GRB2 nouvellement identifié dans nos travaux, ARHGEF35, est une protéine dont l'existence est démontrée au niveau transcriptionnel et protéique par des analyses à grande échelle (Debily, 2003; Dephoure et al., 2008). Cependant, aucune publication concernant cette protéine n'est recensée dans la littérature. Sa séquence est hautement similaire à celle de la partie N-terminale d'ARHGEF5 (98,76% de similarité), ne présentant aucun domaine catalytique ou d'interaction connu (Chan et al., 1994). Cette forte homologie de séquence entraîne l'absence d'anticorps spécifique à chacune de ces protéines. Cependant nos travaux ont permis de valider la présence de chacune d'elles grâce au séquençage par spectrométrie de masse de sept peptides spécifiques à ARHGEF35. Le

facteur d'échange de nucléotides guanyliques ARHGEF5 est une RHO GEF de la famille DBL, et a été caractérisée pour la première fois en tant qu'oncogène dans le tissu mammaire, d'où son nom initial, TIM, pour *Transforming Immortalized Mammary oncogene* (Chan et al., 1994). L'interaction d'ARHGEF5 avec GRB2 a déjà été caractérisée par des méthodes de criblage à haut débit et a également été identifiée dans notre modèle de cancer du sein HER2+ (Li et al., 2014a). Bien que les mécanismes à l'origine de son rôle dans la progression tumorale soient peu décrits dans la littérature, une étude a démontré une expression spécifique au cancer du sein de variants d'ARHGEF5 constitutivement actifs. Les auteurs ont ainsi proposé un rôle de cette protéine dépendant de son activité catalytique dans la progression tumorale, favorisant l'activation de RHO GTPases impliquées dans la migration cellulaire notamment (Debily, 2003). L'association de GRB2 à ARHGEF5 et ARHGEF35 dans notre modèle de cancer du sein HER2+ suggère que la partie N-terminale d'ARHGEF5, hautement similaire à ARHGEF35, est responsable de l'association de ces deux protéines à GRB2. Cependant, l'association d'ARHGEF5 à GRB2 a été caractérisée indépendamment du traitement au pervanadate, et celle d'ARHGEF35 uniquement en absence de traitement, suggérant que leur association à GRB2 puissent être régies par différents mécanismes. De plus, la séquence d'ARHGEF35, ainsi que la séquence correspondante d'ARHGEF5 ne présentent aucun site consensus de liaison du domaine SH2 à des résidus tyrosines phosphorylées. Ceci suggère fortement que l'interaction de ces deux protéines à GRB2 ne soient pas régulée positivement par des événements de phosphorylation sur tyrosine, et ne dépendent pas du domaine SH2 de la protéine adaptatrice.

Enfin une nouvelle interaction entre GRB2 et MPZL1, présentée au chapitre 2 et discutée dans la section 4.2, a également été identifiée par nos travaux.

L'analyse des réseaux d'interactions de GRB2 dans des cellules cancéreuses mammaires HER2+ nous a donc permis de décrire cinq nouveaux partenaires de GRB2. Ces derniers pourraient être surexprimés dans ce modèle cellulaire, et ainsi induire des modifications dans la stoechiométrie de leur association à GRB2. À l'inverse, ces partenaires pourraient appartenir à des complexes signalétiques spécifiques à la suractivation de HER2 et soutenir la signalisation pro-oncogénique de ce récepteur. La caractérisation de ces interactions, notamment la détermination des interactions directes de GRB2, assurant le recrutement de

ces partenaires au récepteur HER2 activé, sera un point crucial pour l'étude de l'implication de ces interactions dans le processus oncogénique HER2+.

4.1.2 Des interactions de GRB2 régulées par phosphorylation sont favorisées dans des cellules de cancer du sein HER2+

La caractérisation des partenaires de GRB2 dans des cellules de cancer du sein HER2+ humaines avec ou sans traitement par l'inhibiteur de tyrosine phosphatases pervanadate nous a donc permis d'identifier cinq nouvelles protéines associées à cette protéine adaptatrice. Le traitement pervanadate est utilisé dans notre cas pour enrichir les interactions de GRB2 dépendant de phosphorylation sur tyrosine. Ces interactions phospho-dépendantes ne sont donc généralement pas observées dans les complexes en absence de traitement pervanadate ou de stimulation favorisant cette phosphorylation (Bisson et al., 2011). En sus des cinq nouvelles interactions discutées ci-dessus, ces expériences ont également mis en évidence la présence de protéines caractérisées pour leur association phospho-dépendante avec GRB2, dépendant du domaine SH2 de la protéine adaptatrice (Bisson et al., 2011; Tashiro et al., 2009). De façon intéressante, six de ces interacteurs, soient HER2, EGFR, PTPN11, PIK3R1, GAREM et SHC1, ont été caractérisés dans les complexes de GRB2 même en absence de stimulation ou traitement PV dans notre modèle de cancer du sein HER2+ (chapitre 2.5.1). Ces six protéines sont impliquées dans la signalisation dépendante des récepteurs HER et favorisent ainsi le processus tumoral HER2-dépendant (Araki et al., 2003; Chu et al., 2005; Masuda et al., 2012; Northey et al., 2013; Rexer et al., 2011; Saal et al., 2005; Slamon et al., 1987; Tashiro et al., 2009). Ces résultats suggèrent ainsi que la suractivation de HER2 dans le cancer du sein conduit à une phosphorylation soutenue d'effecteurs cytoplasmiques, modulant ainsi leur interaction à GRB2. Il est évident que les récepteurs HER2 et EGFR démontrent une phosphorylation plus importante dans le cancer du sein HER2+ (Dankort et al., 1997; Schneider and Yarden, 2016). Ceci pourrait être vérifié par des analyses de phosphoprotéomique de différentes lignées de cancer du sein HER2+ et HER2-, ou en comparant des lignées mammaires non cancéreuses avec les mêmes lignées surexprimant une version exogène de HER2. Des analyses semblables ont par ailleurs décrit que PTPN11 et

PI3KR1 présentent une augmentation de leur phosphorylation sur tyrosine dans le contexte du cancer du sein HER2+ (Ali et al., 2014).

L'identification de nouveaux partenaires de GRB2 dans ce modèle de cancer du sein HER2+, ainsi que les modifications des interactions connues de cette protéine adaptatrice constituent ainsi un premier argument soutenant l'hypothèse que les réseaux de GRB2 sont modulés dans le cancer du sein HER2+.

4.2 Un nouveau complexe constitué de MPZL1, PTPN11 et GRB2 a été identifié dans des cellules de cancer du sein HER2+

Un des nouveaux partenaires de GRB2 identifiés par nos travaux, MPZL1, est une glycoprotéine membranaire impliquée dans l'adhésion et la migration cellulaires sur certains constituants de la matrice extracellulaire (Eminaga and Bennett, 2008; Roubelakis et al., 2007; Zannettino et al., 2003; Zhao and Zhao, 1998). Il a par ailleurs été démontré que la protéine MPZL1 favorise le processus métastatique dans le cancer hépatique ainsi que la prolifération cellulaire HER2-dépendante dans le cancer du sein HER2+ (Jia et al., 2014; Lapin et al., 2014). La nouvelle interaction identifiée par nos travaux pourrait ainsi appartenir à un complexe signalétique favorisé dans le cancer du sein HER2+ et participer à la progression tumorale dépendante de HER2. Nous nous sommes donc intéressés à caractériser cette interaction plus précisément (chapitre 2).

Nous avons démontré que l'interaction de GRB2 avec MPZL1 requiert la tyrosine phosphatase PTPN11, dont les deux domaines SH2 sont connus pour lier deux résidus tyrosines phosphorylés (Y241 et Y263) de MPZL1 (Zhao et al., 2002). Nous avons par ailleurs déterminé que le recrutement de GRB2 dans le complexe MPZL1-PTPN11 dépend du domaine SH2 de cette protéine adaptatrice, ainsi que de la phosphorylation des tyrosines 241 et 263 de MPZL1. Il a précédemment été déterminé que l'association de GRB2 à PTPN11 requiert le domaine SH2 de la protéine adaptatrice, qui peut lier deux tyrosines phosphorylées de la phosphatase, Y546 et Y584 (Minoo et al., 2003). Nos résultats concordent ainsi avec la littérature, selon un modèle où l'association de MPZL1 et GRB2 s'effectue grâce à PTPN11 qui ponte l'interaction (Minoo et al., 2003; Zhao et al., 2002).

De façon intéressante, il avait été mis en évidence au début des années 2000 que l'activation dépendante de son ligand du récepteur à la prolactine (PRLR) induit l'association de PTPN11 et GRB2, via la liaison du domaine SH2 de GRB2 aux tyrosines Y546 et Y584 de PTPN11 phosphorylées. Cette étude avait également souligné dans ces conditions le recrutement d'une protéine phosphorylée de 29 kDa (notée p29) dans un complexe incluant GRB2 et une forme catalytiquement inactive de PTPN11 (Minoo et al., 2003). Il est envisageable que cette protéine de 29 kDa corresponde à une forme peu glycosylée de la protéine MPZL1, et que la stimulation du récepteur PRLR favorise la formation du complexe GRB2-PTPN11-MPZL1 identifié dans nos travaux.

Nous avons par la suite démontré que l'adhésion cellulaire sur fibronectine induit la formation du complexe nouvellement identifié MPZL1-PTPN11-GRB2 à la membrane. Cependant, la régulation de la phosphorylation de MPZL1, requise à la formation du complexe, demeure inexpliquée. En effet, il a été décrit que la glycoprotéine membranaire MPZL1 est constitutivement associée à la kinase SRC. L'adhésion cellulaire sur fibronectine favorise la phosphorylation par SRC de MPZL1 par un mécanisme non décrit à ce jour (Eminaga and Bennett, 2008; Zhao et al., 2002). Deux hypothèses pourraient expliquer ceci. Soit MPZL1 peut lier des protéines extracellulaires tel que précédemment suggéré (Zhao et al., 2002), entraînant un changement conformationnel dépendant du ligand favorisant sa phosphorylation. Soit certaines intégrines, lors de leur liaison à leurs ligands, peuvent réguler l'activité de SRC associée à MPZL1 et ainsi stimuler la phosphorylation de MPZL1. De façon intéressante, différentes études ont décrit que la protéine adaptatrice GRB2 participe à la transduction du signal en aval des intégrines et à l'intégration de ces signaux à d'autres voies de signalisation, en favorisant le recrutement de certaines protéines membranaires dans les regroupements d'intégrines activées (Barcus et al., 2013; Cheng et al., 2014; Galbaugh et al., 2010). Par exemple, il a été montré que GRB2 favorise l'association de PTPRA, SIRPa et PRLR aux groupements d'intégrines activées, modulant ainsi l'activité signalétique de ces protéines selon le contexte cellulaire (Barcus et al., 2013; Cheng et al., 2014; Galbaugh et al., 2010). Le récepteur PRLR activé par son ligand active classiquement la voie JAK/STAT5, favorisant en aval la différenciation alvéolaire de cellules épithéliales mammaires ainsi que le maintien de leur programme de différenciation (Cui et al., 2004; Wagner et al., 2004). À l'inverse, en présence d'une matrice extracellulaire de collagène

dense et rigide, le récepteur PRLR associé avec des intégrines $\beta 1$ activées induit alors l'activation de la voie RAS/MAPK via le recrutement de GRB2, favorisant ainsi la prolifération cellulaire (Barcus et al., 2013). Ces mécanismes de régulation dépendants du microenvironnement sont cruciaux dans la glande mammaire, où le maintien de l'homéostasie épithéliale dépend grandement des interactions avec le stroma (Barcus et al., 2013; Nisticò et al., 2014). La protéine adaptatrice GRB2 pourrait, par des mécanismes similaires, faciliter le recrutement de MPZL1 liée à SRC dans les groupements d'intégrines activées par leur liaison à la fibronectine, favorisant ainsi l'activation de SRC et la phosphorylation subséquente de MPZL1, tel que décrit pour PTPRA et SIRP α (Cheng et al., 2014; Galbaugh et al., 2010; Playford and Schaller, 2004). L'étude de la régulation de l'association de ce complexe signalétique, ainsi que des composants de la matrice extracellulaire stimulant sa formation pourrait permettre de déterminer si ce complexe est dérégulé dans le cancer du sein HER2+ et quels sont les facteurs favorisant son assemblage dans ce contexte.

L'interaction de GRB2 et MPZL1 caractérisée par nos travaux pourrait être la conséquence d'une dérégulation de la formation de ce complexe dans notre modèle de cancer du sein HER2+, tout comme d'une modification du niveau d'expression d'un des composants du complexe dans ce contexte. L'expression de MPZL1 est ubiquitaire, et il a été montré que sa phosphorylation et son association à PTPN11 sont nécessaires à des étapes très précoces du développement embryonnaire telles que la gastrulation chez le poisson zèbre (Paardekooper Overman et al., 2014; Roubelakis et al., 2007; Zhao and Zhao, 2003). Ces données suggèrent fortement que le complexe MPZL1-PTPN11 joue un rôle général dans la signalisation cellulaire. Par ailleurs, bien qu'elle n'ait jamais été identifiée par des approches similaires à celle utilisée dans nos travaux, nous avons identifié l'interaction entre GRB2 et MPZL1 par Western blot dans la lignée non cancéreuse HEK293T, qui ne surexprime pas le récepteur HER2. L'interaction entre ces deux protéines observées pour la première fois dans des cellules de cancer du sein HER2+ pourrait alors être favorisée par ce contexte cellulaire plutôt qu'y être spécifique. L'explication la plus pertinente de cette augmentation d'interaction dans les cellules de cancer du sein HER2+ serait que l'un des partenaires soit surexprimé. Toutefois, les niveaux d'expression de MPZL1 et GRB2 sont très inférieurs dans la lignée HCC1954 comparativement à la lignée HEK293T, dans laquelle des analyses par

AP-MS des interactions de GRB2 n'ont pas identifié MPZL1 (Bisson et al., 2011, données non montrées). Par ailleurs, il a été suggéré que les fonctions de MPZL1 dans la migration et l'adhésion cellulaires soient dépendantes des modèles cellulaires. Des travaux ont suggéré un rôle de l'isoforme inactif MPZL1b, dont les niveaux d'expression relatifs sont très variables au niveau tissulaire, dans la régulation des fonctions signalétiques de MPZL1 (Kusano et al., 2008). De plus, il a été suggéré que la glycosylation de MPZL1 soit également spécifique à chaque tissu (Zannettino et al., 2003; Zhao and Zhao, 2003). Ces deux paramètres pourraient réguler la phosphorylation de MPZL1, et ainsi son association à PTPN11 et GRB2, modulant potentiellement ses fonctions signalétiques dans l'adhésion et la migration cellulaires.

D'autre part, tel que mentionné précédemment, un complexe constitué de GRB2, PTPN11 et d'une protéine de 29 kDa, poids moléculaire de la forme non glycosylée de MPZL1, a été décrit dans une lignée de cancer du sein HER2- (Minoo et al., 2003). Cependant, l'association de la protéine de 29 kDa n'a été observée qu'en présence d'une forme catalytiquement inactive de PTPN11, théoriquement incapable de déphosphoryler ses substrats tels que MPZL1. Ceci suggère que l'association phospho-dépendante de ces trois protéines est très transitoire dans ce modèle cellulaire. Cette étude avait toutefois souligné que la phosphorylation de PTPN11 sur les deux tyrosines lui permettant de lier GRB2 était nécessaire à la formation du complexe GRB2-PTPN11-p29 (Minoo et al., 2003). De façon intéressante, la protéine PTPN11 est retrouvée associée à GRB2 indépendamment de l'inhibiteur de tyrosine phosphatases pervanadate dans nos travaux, suggérant que la surexpression de HER2 favorise la phosphorylation soutenue de PTPN11 (Zhou and Agazie, 2009) et ainsi son association à GRB2 et potentiellement p29 et/ou MPZL1.

De plus, une étude récente a démontré que la protéine MPZL1 est un régulateur de la prolifération dépendante de HER2 de cellules du cancer du sein (Lapin et al., 2014). En accord avec la littérature et les résultats des travaux conduits ici, nous proposons que des dérégulations dans la signalisation de HER2 participent au recrutement aberrant de SRC et MPZL1 dans les regroupements d'intégrines et à la promotion de l'association de GRB2 à PTPN11, favorisant de ce fait la formation du complexe caractérisé ici, ainsi que la promotion en aval de l'adhésion et de la migration cellulaires. (Cheng et al., 2014; Galbaugh et al., 2010; Playford and Schaller, 2004). Le complexe signalétique identifié par ces travaux pourrait

ainsi être favorisé par la dérégulation de nombreuses voies de signalisation plutôt que par la simple suractivation de HER2, et être impliqué dans l'oncogenèse et le processus métastatique.

4.3 Les réseaux signalétiques de GRB2 sont modulés dans des modèles de progression tumorale

De par sa capacité à interagir avec différentes combinaisons de récepteurs et d'effecteurs et ainsi à assurer la nucléation de complexes signalétiques spécifiques, la protéine adaptatrice GRB2 permet d'augmenter et de contrôler la diversité et spécificité des réponses cellulaires (Pawson and Nash, 2003). Compte tenu du rôle clé de GRB2 dans la progression tumorale du cancer du sein HER2+, nous avons postulé que les réseaux de signalisation de GRB2 sont modulés lors de la progression tumorale, permettant ainsi à GRB2 d'assumer une fonction de soutien du processus oncogénique et plus particulièrement métastatique (Cheng et al., 1998; Dankort et al., 2001; Giubellino et al., 2007). Nous avons donc caractérisé ces réseaux signalétiques dépendants de GRB2 dans deux modèles de progression tumorale, le premier *in vitro* mimant la transition épithélio-mésenchymateuse (chapitre 3.1), le second *in vivo* permettant d'intégrer l'implication des interactions cellules tumorales/microenvironnement (chapitre 3.2). Ces analyses ont permis de décrire des modifications dans la nature des partenaires de GRB2, mais également dans l'intensité de ces interactions au sein des réseaux de GRB2 dans ces modèles.

4.3.1 GRB2 interagit avec de nouveaux interacteurs dans deux modèles de progression tumorale

Les réseaux de GRB2 dans nos deux modèles de progression tumorale incluent des partenaires de GRB2 qui n'ont pas été identifiés dans les contrôles. Nous avons ainsi identifié 18 partenaires inclus dans les réseaux de signalisation de GRB2 exclusivement après modélisation de la progression tumorale, soit dans les lignées explantées de tumeurs mammaires chez la souris, soit après traitement au TGF β . Tel que mentionné dans la section 3.3, la majorité de ces partenaires (11 sur 18) sont des interacteurs connus de GRB2, appuyant ainsi la validité de notre approche.

De façon intéressante, la plupart des nouveaux partenaires identifiés ici sont connus pour être impliqués dans la progression tumorale, soulignant la pertinence biologique de nos travaux. Notamment, la protéine 14-3-3 σ ou SFN, qui n'est pas reconnue dans la littérature comme partenaire de GRB2, a été retrouvée dans les réseaux de GRB2 exclusivement après modélisation de la progression tumorale, dans nos deux modèles. SFN appartient à la famille des protéines 14-3-3, dont la plupart des membres sont connus pour interagir avec GRB2 (Bisson et al., 2011). Cette protéine adaptatrice impliquée dans l'inhibition du cycle cellulaire est induite après dommages à l'ADN. Elle a ainsi été proposée comme protéine anti-tumorale, corrélant avec la diminution de son expression observée dans différents cancers (Hermeking et al., 1997; Lodygin and Hermeking, 2005). Cependant, des études plus récentes ont également décrit un rôle pro-tumoral pour cette protéine, notamment dans le cancer du poumon où SFN favorise la prolifération cellulaire, ainsi que la formation de tumeurs primaires et de métastases *in vivo* (Boudreau and Bissell, 2010; Ko et al., 2014; Shiba-Ishii et al., 2015). Les mécanismes soutenant les fonctions pro-oncogéniques de cet inhibiteur du cycle cellulaire demeurent peu documentées. L'identification dans nos travaux d'une association spécifique à la progression tumorale entre GRB2 et SFN suggère que cette interaction puisse participer aux fonctions pro-oncogéniques de ce partenaire. Par ailleurs, de nombreuses études à haut débit ont décrit une interaction entre SFN et EGFR, suggérant que l'association de GRB2 à cette dernière puisse être indirecte, ou bien que GRB2 assure le recrutement de SFN aux récepteurs actifs (Li et al., 2013; Petschnigg et al., 2014). La description des déterminants moléculaires régulant cette interaction et sa modulation dans le

cancer du sein HER2+ pourraient ainsi permettre de clarifier le rôle de cette association, notamment dans la promotion de la signalisation pro-oncogénique dépendante de la signalisation par les récepteurs HER.

Par ailleurs, plusieurs études soulignent un rôle de GRB2 dans la transduction du signal spécifique à la progression tumorale dans la glande mammaire. Par exemple, GRB2 assure la transduction d'un signal pro-prolifératif soutenu en aval du récepteur de la prolactine ou encore la transduction du signal induisant la transition épithélio-mésenchymateuse en aval du récepteur au TGF β (Barcus et al., 2013; Galliher-Beckley and Schiemann, 2008). Les nouvelles interactions de GRB2 identifiées par nos travaux pourraient ainsi appartenir à des voies de signalisation spécifiques à la progression du cancer du sein HER2+.

Ces partenaires nouvellement caractérisés constituent de ce fait des cibles thérapeutiques potentielles très prometteuses. En effet, l'inhibition des fonctions signalétiques de GRB2, très étudiée au début des années 2000, induit une très forte réduction de la masse tumorale et des métastases dans le cancer du sein, notamment HER2+; cependant, aucun des inhibiteurs décrits dans la littérature n'a été testé en phase clinique (Giubellino et al., 2007; Iwata et al., 2013; Morlacchi et al., 2014; Tanaka et al., 2012). Ceci est possiblement attribuable à la fenêtre thérapeutique très réduite offerte par des inhibiteurs généraux de GRB2, requise à un nombre important de processus cellulaires fondamentaux (Belov and Mohammadi, 2012). L'inhibition d'interactions spécifiques de GRB2 avec des partenaires impliqués dans la progression tumorale du cancer du sein HER2+ constituerait ainsi une approche thérapeutique plus pertinente.

4.3.2 Les réseaux signalétiques de GRB2 présentent des modulations d'interaction dans deux modèles de progression tumorale

En sus des nouveaux interacteurs identifiés après modélisation de la progression tumorale, la modulation de l'association d'un nombre important de partenaires connus de GRB2 avec cette dernière a été soulignée par nos travaux. Par exemple, les protéines YWHAQ et WIPF2, ne sont associées à GRB2 qu'après traitement pervanadate dans la lignée de cancer du sein HER2+ avant modélisation de la progression tumorale. Ces deux protéines sont toutefois retrouvées en complexe avec la protéine adaptatrice dans la première lignée explantée de

tumeur mammaire primaire même en absence d'inhibition des tyrosine phosphatases. Ceci suggère que la sélection exercée par le microenvironnement de la glande mammaire sur les cellules tumorales a conduit à l'établissement d'une phosphorylation soutenue de certains interacteurs phospho-dépendants de GRB2, induisant leur recrutement dans les réseaux de signalisation de GRB2 en absence de stimulation.

La diminution ou perte d'interaction d'un grand nombre de partenaires de GRB2 avec cette dernière a également été observée dans ces travaux. De façon intéressante, une forte proportion de ces interacteurs sont impliqués dans la signalisation pro-oncogénique dépendante des récepteurs HER, tels que EGFR et HER2 eux-mêmes, ou encore GAREM et CRKL. Ceci suggère que les réseaux signalétiques nucléés par GRB2 commutent d'un état favorisant la prolifération dépendante de HER à un état moins dépendant de la signalisation des récepteurs HER, soutenant le processus métastatique au cours de la progression tumorale. Cependant, il a été démontré que le recrutement direct de GRB2 à HER2 conduit chez la souris à l'établissement de tumeurs mammaires focales de petite taille et favorise une formation plus importante de métastases, comparativement à l'association du récepteur à SHC1 par exemple (Dankort et al., 2001). Ces résultats suggèrent, à l'inverse de nos observations, que les interactions de GRB2 soutiennent le processus métastatique en aval de HER2 plus que la prolifération. Ces études ont toutefois été menées dans des modèles différents (xénogreffes orthotopiques ou modèles transgéniques). Des analyses couplant la caractérisation des réseaux de GRB2 avec la formation de tumeurs primaires et de métastases pourraient permettre de clarifier ce point.

De façon intéressante, quatre partenaires connus de GRB2 voient leur association à celle-ci diminuée dans nos deux modèles de progression tumorale. Ces quatre interacteurs, GAREM, PTPRA, DNM2 et CBLB, sont connus pour être impliqués dans la progression tumorale, tel que discuté au chapitre 3.3 (Boivin et al., 2013; Cheng et al., 2014; Tashiro et al., 2009; Vennin et al., 2015; Yamada et al., 2016). Par ailleurs, deux d'entre eux (PTPRA et DNM2) sont proposés présenter des fonctions pro- ou anti-tumorales en fonction du contexte cellulaire, tout comme SFN, suggérant que leur association à GRB2 pourrait également réguler ces fonctions dépendantes du contexte cellulaire (Boivin et al., 2013; Lee et al., 2010; Yamada et al., 2016).

4.4 Les interactions de GRB2 identifiées suggèrent que la surexpression de HER2 induit des modifications dans les réseaux signalétiques dépendants de GRB2

Les modulations des réseaux d’interactions de GRB2 décrites par nos travaux et discutées ci-dessus ont ainsi été caractérisées pour la première fois dans notre modèle de cancer du sein HER2+. Cependant, ces modulations peuvent dépendre de la suractivation de HER2 tout comme de variations dépendantes du modèle cellulaire non reliées à la surexpression du récepteur oncogénique, comme par exemple la surexpression d’un des partenaires. Nos travaux ne permettent donc pas de démontrer que la suractivation du récepteur HER2 induise directement les régulations dans les réseaux de GRB2 décrites ici. Ce point nécessiterait l’étude de ces interactions dans un modèle cellulaire surexprimant HER2 WT ou un mutant catalytiquement inactif (HER2 K753M) (Klos et al., 2006; Li et al., 2004). L’interaction entre GRB2 et MPZL1 a ainsi été étudiée dans des cellules HEK293T surexprimant l’une des deux formes du récepteur; cependant, aucune modification de l’interaction en fonction de l’activité de HER2 n’a pu être mise en évidence par analyses Western blot des purifications de GRB2 (données non montrées). De plus, de nombreuses études soulignent la nécessité de multiplier les modèles cellulaires, notamment dans le contexte du cancer du sein afin d’obtenir des résultats biologiquement pertinents (Ursini-Siegel et al., 2007; Vargo-Gogola and Rosen, 2007). L’analyse des réseaux d’interaction de GRB2 dans un panel de lignées cellulaires de cancer du sein HER2+ permettrait d’une part l’affranchissement des biais de variations dépendantes du modèle cellulaire, mais également l’identification des modulations d’interactions corrélant avec l’agressivité de chaque lignée. Par ailleurs, l’utilisation de la récente technique d’étiquetage de proximité BioID pourrait permettre d’identifier des interactions de GRB2 plus transitoires dans ces modèles de cancer du sein HER2+ (Roux et al., 2012). Enfin, bien que les données du laboratoire démontrent que les niveaux d’expression de GRB2 ne régulent pas ses interactions (Bisson et al., 2011), il a été montré que la dimérisation de GRB2 en solution affecte la stœchiométrie de certaines de ses interactions (Ahmed et al., 2015; Lin et al., 2012; McDonald et al., 2008b, 2012, 2013). Il a de plus été suggéré que cette dimérisation régule les fonctions biologiques de la protéine adaptatrice (Ahmed et al., 2015; Lin et al., 2012; McDonald et al., 2008b, 2012, 2013). Afin

de s'affranchir de ce biais potentiel, il serait utile d'établir des modèles de cancer du sein HER2+ exprimant la protéine de fusion 3xFLAG-GRB2 sous le contrôle de son promoteur endogène grâce à la technique de CRISPR afin de ne pas modifier les niveaux d'expression de cette dernière (Ratz et al., 2015).

D'autre part, ces travaux, bien que démontrant pour la première fois que les réseaux d'interactions de GRB2 présentent des modulations dans la progression tumorale du cancer du sein HER2+, demeurent descriptifs. La quantification absolue de l'abondance de chaque interacteur dans les complexes de GRB2 dans ces modèles de progression tumorale grâce à l'utilisation de la récente technique de protéomique d'AP-SWATH, permettant la détection et quantification sensible et robuste des protéines d'un échantillon, consoliderait les observations présentées ici (Findlay et al., 2013; Gillet et al., 2012). La corrélation entre l'état d'une interaction de GRB2 et sa fonction dans la progression tumorale pourrait être établie via un criblage des candidats basé sur le modèle de transition épithélio-mésenchymateuse *in vitro*, par exemple. D'autre part, les analyses effectuées dans les lignées explantées de tumeurs primaires chez la souris après xénogreffes ont relevé des différences conséquentes et pertinentes dans les réseaux de GRB2. Ces analyses constituent ainsi une preuve de concept intéressante, suggérant que l'optimisation de notre stratégie pour l'étude des réseaux de GRB2 dans les tumeurs primaires formées chez la souris permettra l'identification de nouvelles variations dans les associations de la protéine adaptatrice spécifiques aux stimulations du microenvironnement et aux interactions entre ce dernier et les cellules tumorales.

Ces travaux pourraient ainsi permettre, à terme, de cartographier précisément les réseaux de signalisation de GRB2 tout en les corrélant avec différents phénotypes cancéreux.

4.5 Conclusion générale

L'objectif de ce projet de recherche était de caractériser les réseaux de signalisation de GRB2 dans le cancer du sein HER2+ en vue d'identifier de nouveaux complexes signalétiques participant au processus oncogénique dépendant de HER2. Nous avons caractérisé cinq nouveaux partenaires de GRB2 dans des cellules de cancer du sein HER2+, et quatre de ces derniers sont décrits dans des mécanismes participant à la progression tumorale (Allen-Petersen et al., 2014; Ikeda et al., 2010; Jia et al., 2014; Lapin et al., 2014; Rao et al., 2012; Weber-Boyyat et al., 2015). Nous avons également caractérisé pour la première fois des modulations dans les réseaux de signalisation de GRB2 dans deux modèles de progression tumorale HER2+, soient les lignées extraites de tumeurs chez la souris et le traitement au TGF β (Galliher-Beckley and Schiemann, 2008; Northey et al., 2008; Vargo-Gogola and Rosen, 2007). Nous avons ainsi mis en évidence une nouvelle interaction de GRB2 avec SFN dans ces deux modèles, suggérant que cette association participe à la progression tumorale. Ces travaux ont également souligné une diminution de l'interaction de quatre partenaires de GRB2 avec cette dernière dans nos deux modèles, suggérant que ces modulations participent elles aussi à la progression tumorale. Enfin, ces données nous ont permis de souligner une tendance globale caractérisée par la diminution de régulateurs positifs de la signalisation des récepteurs HER et l'augmentation d'inhibiteurs de cette signalisation dans les réseaux de GRB2 au cours de la progression tumorale dans nos deux modèles, tant au niveau de la nature de ces partenaires qu'au niveau de leur abondance. Ceci constitue la première évidence soutenant que les réseaux globaux de signalisation de GRB2 sont modulés au cours de la progression tumorale du cancer du sein HER2. L'apparente diminution de l'association des réseaux de GRB2 à la signalisation induite par HER2 dans ces modèles de progression tumorale est surprenante et constitue une information précieuse. En effet, dans le cadre des thérapies ciblées de HER2 et des thérapies combinées, la perte de dépendance à GRB2 de la signalisation induite par HER2 pourrait représenter un mécanisme de résistance important, dont la caractérisation pourrait faciliter le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques.

Nous avons par la suite caractérisé la formation d'un complexe signalétique incluant GRB2, PTPN11 et MPZL1 qui ne semble pas dépendre directement de la suractivation de

HER2, mais qui pourrait participer au processus oncogénique. Ce complexe pourrait être impliqué dans la promotion du processus métastatique en favorisant l'adhésion cellulaire à la matrice extracellulaire, la migration cellulaire dans un microenvironnement de type stromal et à l'activation de ERK induite par l'adhésion cellulaire dans ce type de microenvironnement. La caractérisation dans nos travaux des déterminants moléculaires régissant la formation de ce complexe permettra l'étude de son implication fonctionnelle dans le processus oncogénique, et facilitera le cas échéant le développement d'inhibiteurs spécifiques. En effet, l'inhibition de GBR2 dans le cancer du sein HER2+, bien que très prometteuse, a été abandonnée avant les tests cliniques probablement en raison de la fenêtre thérapeutique extrêmement réduite de ces inhibiteurs (Giubellino et al., 2007; Morlacchi et al., 2014). L'inhibition de la formation d'un complexe signalétique spécifique soutenant les fonctions métastatiques de GRB2 offre quant à elle une fenêtre thérapeutique bien plus avantageuse.

En conclusion, ces travaux ont permis de caractériser pour la première fois des modifications dans les réseaux signalétiques de GRB2 dans des modèles de cancer du sein HER2+. De plus, nous avons identifié grâce à nos études 14 partenaires de GRB2 non recensés dans la littérature. La majorité de ces derniers sont décrits dans des mécanismes participant au processus oncogénique, suggérant ainsi que leur association à GRB2 dans nos modèles puisse participer à leurs fonctions oncogéniques. L'étude des déterminants moléculaires de leur association à GRB2 et de l'implication de ces complexes dans la signalisation pro-oncogénique de HER2 permettrait ainsi de mieux comprendre le rôle de GRB2 dans le processus métastatique du cancer du sein HER2+, ainsi que de proposer de nouvelles cibles thérapeutiques.

Bibliographie des chapitres 1, 3 et 4

- Ahmed, Z., George, R., Lin, C.-C., Suen, K.M., Levitt, J.A., Suhling, K., and Ladbury, J.E. (2010). Direct binding of Grb2 SH3 domain to FGFR2 regulates SHP2 function. *Cell. Signal.* 22, 23–33.
- Ahmed, Z., Lin, C.-C., Suen, K.M., Melo, F.A., Levitt, J.A., Suhling, K., and Ladbury, J.E. (2013). Grb2 controls phosphorylation of FGFR2 by inhibiting receptor kinase and Shp2 phosphatase activity. *J. Cell Biol.* 200, 493–504.
- Ahmed, Z., Timsah, Z., Suen, K.M., Cook, N.P., Lee, G.R., IV, Lin, C.-C., Gagea, M., Marti, A.A., and Ladbury, J.E. (2015). Grb2 monomer–dimer equilibrium determines normal versus oncogenic function. *Nat. Commun.* 6.
- Aigner, A., Juhl, H., Malerczyk, C., Tkybusch, A., Benz, C.C., and Czubayko, F. (2001). Expression of a truncated 100 kDa HER2 splice variant acts as an endogenous inhibitor of tumour cell proliferation. *Oncogene* 20, 2101–2111.
- Ajani, J.A., Song, S., Hochster, H.S., and Steinberg, I.B. (2015). Cancer stem cells: the promise and the potential. *Semin. Oncol.* 42 Suppl 1, S3-17.
- Akahira, J., Sugihashi, Y., Suzuki, T., Ito, K., Niikura, H., Moriya, T., Nitta, M., Okamura, H., Inoue, S., Sasano, H., et al. (2004). Decreased Expression of 14-3-3 σ Is Associated with Advanced Disease in Human Epithelial Ovarian Cancer. *Clin. Cancer Res.* 10, 2687–2693.
- Akiyama, T., Sudo, C., Ogawara, H., Toyoshima, K., and Yamamoto, T. (1986). The product of the human c-erbB-2 gene: a 185-kilodalton glycoprotein with tyrosine kinase activity. *Science* 232, 1644–1646.
- Aksamitiene, E., Kiyatkin, A., and Kholodenko, B.N. (2012). Cross-talk between mitogenic Ras/MAPK and survival PI3K/Akt pathways: a fine balance. *Biochem. Soc. Trans.* 40, 139–146.
- Ali, N.A., Wu, J., Hochgräfe, F., Chan, H., Nair, R., Ye, S., Zhang, L., Lyons, R.J., Pinese, M., Lee, H.C., et al. (2014). Profiling the tyrosine phosphoproteome of different mouse mammary tumour models reveals distinct, model-specific signalling networks and conserved oncogenic pathways. *Breast Cancer Res.* 16, 437.

- Allen-Petersen, B.L., Carter, C.J., Ohm, A.M., and Reyland, M.E. (2014). Protein kinase C δ is required for ErbB2-driven mammary gland tumorigenesis and negatively correlates with prognosis in human breast cancer. *Oncogene* 33, 1306–1315.
- Anastasi, S., Fiorentino, L., Fiorini, M., Fraioli, R., Sala, G., Castellani, L., Alemà, S., Alimandi, M., and Segatto, O. (2003). Feedback inhibition by RALT controls signal output by the ErbB network. *Oncogene* 22, 4221–4234.
- Andrechek, E.R., Hardy, W.R., Siegel, P.M., Rudnicki, M.A., Cardiff, R.D., and Muller, W.J. (2000). Amplification of the neu/erbB-2 oncogene in a mouse model of mammary tumorigenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97, 3444–3449.
- Andrechek, E.R., White, D., and Muller, W.J. (2004). Targeted disruption of ErbB2/Neu in the mammary epithelium results in impaired ductal outgrowth. *Oncogene* 24, 932–937.
- Araki, T., Nawa, H., and Neel, B.G. (2003). Tyrosyl Phosphorylation of Shp2 Is Required for Normal ERK Activation in Response to Some, but Not All, Growth Factors. *J. Biol. Chem.* 278, 41677–41684.
- Asanuma, H., Torigoe, T., Kamiguchi, K., Hirohashi, Y., Ohmura, T., Hirata, K., Sato, M., and Sato, N. (2005). Survivin Expression Is Regulated by Coexpression of Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 and Epidermal Growth Factor Receptor via Phosphatidylinositol 3-Kinase/AKT Signaling Pathway in Breast Cancer Cells. *Cancer Res.* 65, 11018–11025.
- Azambuja, E. de, Holmes, A.P., Piccart-Gebhart, M., Holmes, E., Cosimo, S.D., Swaby, R.F., Untch, M., Jackisch, C., Lang, I., Smith, I., et al. (2014). Lapatinib with trastuzumab for HER2-positive early breast cancer (NeoALTTO): survival outcomes of a randomised, open-label, multicentre, phase 3 trial and their association with pathological complete response. *Lancet Oncol.* 15, 1137–1146.
- Bajaj, M., Waterfield, M.D., Schlessinger, J., Taylor, W.R., and Blundell, T. (1987). On the tertiary structure of the extracellular domains of the epidermal growth factor and insulin receptors. *Biochim. Biophys. Acta* 916, 220–226.
- Balkwill, F., Charles, K.A., and Mantovani, A. (2005). Smoldering and polarized inflammation in the initiation and promotion of malignant disease. *Cancer Cell* 7, 211–217.
- Banjade, S., Wu, Q., Mittal, A., Peeples, W.B., Pappu, R.V., and Rosen, M.K. (2015). Conserved interdomain linker promotes phase separation of the multivalent adaptor protein Nck. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 112, E6426–E6435.

- Barcus, C.E., Keely, P.J., Eliceiri, K.W., and Schuler, L.A. (2013). Stiff Collagen Matrices Increase Tumorigenic Prolactin Signaling in Breast Cancer Cells. *J. Biol. Chem.* **288**, 12722–12732.
- Bargmann, C.I., and Weinberg, R.A. (1988). Increased tyrosine kinase activity associated with the protein encoded by the activated *neu* oncogene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **85**, 5394.
- Barker, K.T., Jackson, L.E., and Crompton, M.R. (1997). BRK tyrosine kinase expression in a high proportion of human breast carcinomas. *Oncogene* **15**, 799–805.
- Bartelt, R.R., Light, J., Vacaflores, A., Butcher, A., Pandian, M., Nash, P., and Houtman, J.C.D. (2015). Regions outside of conserved PxxPxR motifs drive the high affinity interaction of GRB2 with SH3 domain ligands. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* **1853**, 2560–2569.
- Baselga, J., Gelmon, K.A., Verma, S., Wardley, A., Conte, P., Miles, D., Bianchi, G., Cortes, J., McNally, V.A., Ross, G.A., et al. (2010). Phase II Trial of Pertuzumab and Trastuzumab in Patients With Human Epidermal Growth Factor Receptor 2-Positive Metastatic Breast Cancer That Progressed During Prior Trastuzumab Therapy. *J. Clin. Oncol.* **28**, 1138–1144.
- Baselga, J., Cortés, J., Kim, S.-B., Im, S.-A., Hegg, R., Im, Y.-H., Roman, L., Pedrini, J.L., Pienkowski, T., Knott, A., et al. (2012). Pertuzumab plus Trastuzumab plus Docetaxel for Metastatic Breast Cancer. *N. Engl. J. Med.* **366**, 109–119.
- Basier, K., and Hafen, E. (1988). Control of photoreceptor cell fate by the sevenless protein requires a functional tyrosine kinase domain. *Cell* **54**, 299–311.
- Beigbeder, A., Vélot, L., James, D.A., and Bisson, N. (2016). Sample Preparation for Mass Spectrometry Analysis of Protein-Protein Interactions in Cancer Cell Lines and Tissues. *Methods Mol. Biol.* Clifton NJ **1458**, 339–347.
- Beigbeder, A., Chartier, F.J.M., and Bisson, N. (2017). MPZL1 forms a signalling complex with GRB2 adaptor and PTPN11 phosphatase in HER2-positive breast cancer cells. *Sci. Rep.* **7**, 11514.
- Beitel, G.J., Clark, S.G., and Horvitz, H.R. (1990). *Caenorhabditis elegans ras gene let-60* acts as a switch in the pathway of vulval induction. *Nature* **348**, 503–509.
- Belov, A.A., and Mohammadi, M. (2012). Grb2, a Double-Edged Sword of Receptor Tyrosine Kinase Signaling. *Sci. Signal.* **5**, pe49-pe49.

- Benfield, A.P., Whiddon, B.B., Clements, J.H., and Martin, S.F. (2007). Structural and energetic aspects of Grb2-SH2 domain-swapping. *Arch. Biochem. Biophys.* *462*, 47–53.
- Benzinger, A., Muster, N., Koch, H.B., Yates, J.R., and Hermeking, H. (2005). Targeted Proteomic Analysis of 14-3-3 ζ , a p53 Effector Commonly Silenced in Cancer. *Mol. Cell. Proteomics* *4*, 785–795.
- Bergeret, E., Pignot-Paintrand, I., Guichard, A., Raymond, K., Fauvarque, M.O., Cazemajor, M., and Griffin-Shea, R. (2001). RotundRacGAP functions with Ras during spermatogenesis and retinal differentiation in *Drosophila melanogaster*. *Mol. Cell. Biol.* *21*, 6280–6291.
- Bierie, B., and Moses, H.L. (2006). Tumour microenvironment: TGF β : the molecular Jekyll and Hyde of cancer. *Nat. Rev. Cancer* *6*, 506–520.
- Bissell, M.J., and Hines, W.C. (2011). Why don't we get more cancer? A proposed role of the microenvironment in restraining cancer progression. *Nat. Med.* *17*, 320–329.
- Bissell, M.J., Radisky, D.C., Rizki, A., Weaver, V.M., and Petersen, O.W. (2002). The organizing principle: microenvironmental influences in the normal and malignant breast. *Differentiation* *70*, 537–546.
- Bissell, M.J., Rizki, A., and Mian, I.S. (2003). Tissue architecture: the ultimate regulator of breast epithelial function. *Curr. Opin. Cell Biol.* *15*, 753–762.
- Bissell, M.J., Kenny, P.A., and Radisky, D.C. (2005). Microenvironmental Regulators of Tissue Structure and Function Also Regulate Tumor Induction and Progression: The Role of Extracellular Matrix and Its Degrading Enzymes. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* *70*, 343–356.
- Bisson, N., James, D.A., Ivosev, G., Tate, S.A., Bonner, R., Taylor, L., and Pawson, T. (2011). Selected reaction monitoring mass spectrometry reveals the dynamics of signaling through the GRB2 adaptor. *Nat. Biotechnol.* *29*, 653–658.
- Bladt, F., Aippersbach, E., Gelkop, S., Strasser, G.A., Nash, P., Tafuri, A., Gertler, F.B., and Pawson, T. (2003). The Murine Nck SH2/SW3 Adaptors Are Important for the Development of Mesoderm-Derived Embryonic Structures and for Regulating the Cellular Actin Network. *Mol. Cell. Biol.* *23*, 4586–4597.
- Bochet, L., Lehuédé, C., Dauvillier, S., Wang, Y.Y., Dirat, B., Laurent, V., Dray, C., Guiet, R., Maridonneau-Parini, I., Le Gonidec, S., et al. (2013). Adipocyte-derived fibroblasts

- promote tumor progression and contribute to the desmoplastic reaction in breast cancer. *Cancer Res.* **73**, 5657–5668.
- Boivin, B., Chaudhary, F., Dickinson, B.C., Haque, A., Pero, S.C., Chang, C.J., and Tonks, N.K. (2013). Receptor Protein-tyrosine Phosphatase α Regulates Focal Adhesion Kinase Phosphorylation and ErbB2 Oncoprotein-mediated Mammary Epithelial Cell Motility. *J. Biol. Chem.* **288**, 36926–36935.
- Bokoch, G.M., Wang, Y., Bohl, B.P., Sells, M.A., Quilliam, L.A., and Knaus, U.G. (1996). Interaction of the Nck Adapter Protein with p21-activated Kinase (PAK1). *J. Biol. Chem.* **271**, 25746–25749.
- Bouchard, L., Lamarre, L., Tremblay, P.J., and Jolicoeur, P. (1989). Stochastic appearance of mammary tumors in transgenic mice carrying the MMTV/c-neu oncogene. *Cell* **57**, 931–936.
- Boudreau, A.T., and Bissell, M.J. (2010). 14-3-3 sigma as a biomarker of basal breast cancer.
- Bourguignon, L.Y., Zhu, H., Chu, A., Iida, N., Zhang, L., and Hung, M.C. (1997). Interaction between the adhesion receptor, CD44, and the oncogene product, p185HER2, promotes human ovarian tumor cell activation. *J. Biol. Chem.* **272**, 27913–27918.
- Bourguignon, L.Y., Zhu, H., Zhou, B., Diedrich, F., Singleton, P.A., and Hung, M.C. (2001). Hyaluronan promotes CD44v3-Vav2 interaction with Grb2-p185(HER2) and induces Rac1 and Ras signaling during ovarian tumor cell migration and growth. *J. Biol. Chem.* **276**, 48679–48692.
- Bouyain, S., Longo, P.A., Li, S., Ferguson, K.M., and Leahy, D.J. (2005). The extracellular region of ErbB4 adopts a tethered conformation in the absence of ligand. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 15024–15029.
- Brehme, M., Hantschel, O., Colinge, J., Kaupe, I., Planyavsky, M., Köcher, T., Mechtler, K., Bennett, K.L., and Superti-Furga, G. (2009). Charting the molecular network of the drug target Bcr-Abl. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **106**, 7414–7419.
- Brodie, C., and Blumberg, P.M. (2003). Regulation of cell apoptosis by protein kinase c δ . *Apoptosis* **8**, 19–27.
- Brummer, T., Schmitz-Peiffer, C., and Daly, R.J. (2010). Docking proteins. *FEBS J.* **277**, 4356–4369.

- Buday, L., and Downward, J. (1993). Epidermal growth factor regulates p21ras through the formation of a complex of receptor, Grb2 adapter protein, and Sos nucleotide exchange factor. *Cell* 73, 611–620.
- Burack, W.R., and Shaw, A.S. (2000). Signal transduction: hanging on a scaffold. *Curr. Opin. Cell Biol.* 12, 211–216.
- Burdall, S.E., Hanby, A.M., Lansdown, M.R., and Speirs, V. (2003). Breast cancer cell lines: friend or foe? *Breast Cancer Res.* 5, 89.
- Burger, M.M., and Noonan, K.D. (1970). Restoration of normal growth by covering of agglutinin sites on tumour cell surface. *Nature* 228, 512–515.
- Burgess, A.W., Cho, H.-S., Eigenbrot, C., Ferguson, K.M., Garrett, T.P.J., Leahy, D.J., Lemmon, M.A., Sliwkowski, M.X., Ward, C.W., and Yokoyama, S. (2003). An Open-and-Shut Case? Recent Insights into the Activation of EGF/ErbB Receptors. *Mol. Cell* 12, 541–552.
- Byrne, A.T., Alférez, D.G., Amant, F., Annibali, D., Arribas, J., Biankin, A.V., Bruna, A., Budinská, E., Caldas, C., Chang, D.K., et al. (2017). Interrogating open issues in cancer precision medicine with patient-derived xenografts. *Nat. Rev. Cancer* 17, 254–268.
- Cariati, M., Marlow, R., and Dontu, G. (2011). Xenotransplantation of breast cancers. *Methods Mol. Biol.* Clifton NJ 731, 471–482.
- Carpenter, G., King, L., and Cohen, S. (1978). Epidermal growth factor stimulates phosphorylation in membrane preparations in vitro. *Nature* 276, 409–410.
- Case, R.D., Piccione, E., Wolf, G., Benett, A.M., Lechleider, R.J., Neel, B.G., and Shoelson, S.E. (1994). SH-PTP2/Syp SH2 domain binding specificity is defined by direct interactions with platelet-derived growth factor beta-receptor, epidermal growth factor receptor, and insulin receptor substrate-1-derived phosphopeptides. *J. Biol. Chem.* 269, 10467–10474.
- Castaneda, C.A., Cortes-Funes, H., Gomez, H.L., and Ciruelos, E.M. (2010). The phosphatidyl inositol 3-kinase/AKT signaling pathway in breast cancer. *Cancer Metastasis Rev.* 29, 751–759.
- Castiglioni, F., Tagliabue, E., Campiglio, M., Pupa, S.M., Balsari, A., and Ménard, S. (2006). Role of exon-16-deleted HER2 in breast carcinomas. *Endocr. Relat. Cancer* 13, 221–232.
- Chafik, A. (2015). The role of CRKL in breast cancer metastasis: insights from systems biology. *Syst. Synth. Biol.* 9, 141–146.

- Chan, A.M., McGovern, E.S., Catalano, G., Fleming, T.P., and Miki, T. (1994). Expression cDNA cloning of a novel oncogene with sequence similarity to regulators of small GTP-binding proteins. *Oncogene* 9, 1057–1063.
- Chandarlapaty, S., Scaltriti, M., Angelini, P., Ye, Q., Guzman, M., Hudis, C.A., Norton, L., Solit, D.B., Arribas, J., Baselga, J., et al. (2009). Inhibitors of HSP90 block p95-HER2 signaling in Trastuzumab-resistant tumors and suppress their growth. *Oncogene* 29, 325–334.
- Chazaud, C., Yamanaka, Y., Pawson, T., and Rossant, J. (2006). Early Lineage Segregation between Epiblast and Primitive Endoderm in Mouse Blastocysts through the Grb2-MAPK Pathway. *Dev. Cell* 10, 615–624.
- Chen, F., Zhuang, X., Lin, L., Yu, P., Wang, Y., Shi, Y., Hu, G., and Sun, Y. (2015). New horizons in tumor microenvironment biology: challenges and opportunities. *BMC Med.* 13, 45.
- Chen, Z.-L., Shen, Y.-W., Li, S.-T., Li, C.-L., Zhang, L.-X., Yang, J., Lv, M., Lin, Y.-Y., Wang, X., and Yang, J. (2016). The efficiency and safety of trastuzumab and lapatinib added to neoadjuvant chemotherapy in Her2-positive breast cancer patients: a randomized meta-analysis. *OncoTargets Ther.* 9, 3233–3247.
- Cheng, A.M., Saxton, T.M., Sakai, R., Kulkarni, S., Mbamalu, G., Vogel, W., Tortorice, C.G., Cardiff, R.D., Cross, J.C., Muller, W.J., et al. (1998). Mammalian Grb2 Regulates Multiple Steps in Embryonic Development and Malignant Transformation. *Cell* 95, 793–803.
- Cheng, S.Y.S., Sun, G., Schlaepfer, D.D., and Pallen, C.J. (2014). Grb2 Promotes Integrin-Induced Focal Adhesion Kinase (FAK) Autophosphorylation and Directs the Phosphorylation of Protein Tyrosine Phosphatase by the Src-FAK Kinase Complex. *Mol. Cell. Biol.* 34, 348–361.
- Cho, H.-S., and Leahy, D.J. (2002). Structure of the Extracellular Region of HER3 Reveals an Interdomain Tether. *Science* 297, 1330–1333.
- Choi, H., Liu, G., Mellacheruvu, D., Tyers, M., Gingras, A.-C., and Nesvizhskii, A.I. (2012). Analyzing Protein-Protein Interactions from Affinity Purification-Mass Spectrometry Data with SAINT. In *Current Protocols in Bioinformatics*, A.D. Baxevanis, G.A. Petsko, L.D. Stein, and G.D. Stormo, eds. (Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.), p.

- Chou, M.M., Fajardo, J.E., and Hanafusa, H. (1992). The SH2- and SH3-containing Nck protein transforms mammalian fibroblasts in the absence of elevated phosphotyrosine levels. *Mol. Cell. Biol.* *12*, 5834–5842.
- Choudhary, C., and Mann, M. (2010). Decoding signalling networks by mass spectrometry-based proteomics. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *11*, 427–439.
- Chu, I., Blackwell, K., Chen, S., and Slingerland, J. (2005). The Dual ErbB1/ErbB2 Inhibitor, Lapatinib (GW572016), Cooperates with Tamoxifen to Inhibit Both Cell Proliferation- and Estrogen-Dependent Gene Expression in Antiestrogen-Resistant Breast Cancer. *Cancer Res.* *65*, 18–25.
- Chung, A., Cui, X., Audeh, W., and Giuliano, A. (2013). Current status of anti-human epidermal growth factor receptor 2 therapies: predicting and overcoming herceptin resistance. *Clin. Breast Cancer* *13*, 223–232.
- Cichon, M.A., Nelson, C.M., and Radisky, D.C. (2015). Regulation of Epithelial-Mesenchymal Transition in Breast Cancer Cells by Cell Contact and Adhesion. *Cancer Inform.* *14*, 1–13.
- Citri, A., and Yarden, Y. (2006). EGF–ERBB signalling: towards the systems level. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *7*, 505–516.
- Clark, S.G., Stern, M.J., and Horvitz, H.R. (1992). *C. elegans* cell-signalling gene *sem-5* encodes a protein with SH2 and SH3 domains. *Nature* *356*, 340–344.
- Clynes, R.A., Towers, T.L., Presta, L.G., and Ravetch, J.V. (2000). Inhibitory Fc receptors modulate in vivo cytotoxicity against tumor targets. *Nat. Med.* *6*, 443–446.
- Cohen, S. (1962). Isolation of a Mouse Submaxillary Gland Protein Accelerating Incisor Eruption and Eyelid Opening in the New-born Animal. *J. Biol. Chem.* *237*, 1555–1562.
- Cohen, G.B., Ren, R., and Baltimore, D. (1995). Modular binding domains in signal transduction proteins. *Cell* *80*, 237–248.
- Collett, M.S., and Erikson, R.L. (1978). Protein kinase activity associated with the avian sarcoma virus src gene product. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *75*, 2021.
- Combs, A.P., Kapoor, T.M., Feng, S., Chen, J.K., Daudé-Snow, L.F., and Schreiber, S.L. (1996). Protein structure-based combinatorial chemistry: discovery of non-peptide binding elements to Src SH3 domain. *J. Am. Chem. Soc.* *118*, 287–288.

- Cooley, S., Burns, L.J., Repka, T., and Miller, J.S. (1999). Natural killer cell cytotoxicity of breast cancer targets is enhanced by two distinct mechanisms of antibody-dependent cellular cytotoxicity against LFA-3 and HER2/neu. *Exp. Hematol.* 27, 1533–1541.
- Crampton, S.P., Wu, B., Park, E.J., Kim, J.-H., Solomon, C., Waterman, M.L., and Hughes, C.C.W. (2009). Integration of the β -Catenin-Dependent Wnt Pathway with Integrin Signaling through the Adaptor Molecule Grb2. *PLoS ONE* 4, e7841.
- Creighton, C.J., Hilger, A.M., Murthy, S., Rae, J.M., Chinnaiyan, A.M., and El-Ashry, D. (2006). Activation of Mitogen-Activated Protein Kinase in Estrogen Receptor α -Positive Breast Cancer Cells In vitro Induces an In vivo Molecular Phenotype of Estrogen Receptor α -Negative Human Breast Tumors. *Cancer Res.* 66, 3903–3911.
- Crooks, G.E., Hon, G., Chandonia, J.-M., and Brenner, S.E. (2004). WebLogo: A Sequence Logo Generator. *Genome Res.* 14, 1188–1190.
- Cui, Y., Riedlinger, G., Miyoshi, K., Tang, W., Li, C., Deng, C.-X., Robinson, G.W., and Hennighausen, L. (2004). Inactivation of Stat5 in Mouse Mammary Epithelium during Pregnancy Reveals Distinct Functions in Cell Proliferation, Survival, and Differentiation. *Mol. Cell. Biol.* 24, 8037–8047.
- Cunnick, J.M., Meng, S., Ren, Y., Desponts, C., Wang, H.-G., Djeu, J.Y., and Wu, J. (2002). Regulation of the Mitogen-activated Protein Kinase Signaling Pathway by SHP2. *J. Biol. Chem.* 277, 9498–9504.
- Curigliano, G., Burstein, H.J., P. Winer, E., Gnant, M., Dubsky, P., Loibl, S., Colleoni, M., Regan, M.M., Piccart-Gebhart, M., Senn, H.-J., et al. (2017). De-escalating and escalating treatments for early-stage breast cancer: the St. Gallen International Expert Consensus Conference on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2017. *Ann. Oncol.* 28, 1700–1712.
- Cussac, D., Frech, M., and Chardin, P. (1994). Binding of the Grb2 SH2 domain to phosphotyrosine motifs does not change the affinity of its SH3 domains for Sos proline-rich motifs. *EMBO J.* 13, 4011–4021.
- Daëron, M., Jaeger, S., Du Pasquier, L., and Vivier, E. (2008). Immunoreceptor tyrosine-based inhibition motifs: a quest in the past and future. *Immunol. Rev.* 224, 11–43.
- DAI, L., LU, C., YU, X., DAI, L.-J., and ZHOU, J.X. (2015). Construction of orthotopic xenograft mouse models for human pancreatic cancer. *Exp. Ther. Med.* 10, 1033–1038.

- Dang, T.T., Esparza, M.A., Maine, E.A., Westcott, J.M., and Pearson, G.W. (2015). ΔNp63 α Promotes Breast Cancer Cell Motility through the Selective Activation of Components of the Epithelial-to-Mesenchymal Transition Program. *Cancer Res.* *75*, 3925–3935.
- Dankort, D., Maslikowski, B., Warner, N., Kanno, N., Kim, H., Wang, Z., Moran, M.F., Oshima, R.G., Cardiff, R.D., and Muller, W.J. (2001). Grb2 and Shc Adapter Proteins Play Distinct Roles in Neu (ErbB-2)-Induced Mammary Tumorigenesis: Implications for Human Breast Cancer. *Mol. Cell. Biol.* *21*, 1540–1551.
- Dankort, D.L., Wang, Z., Blackmore, V., Moran, M.F., and Muller, W.J. (1997). Distinct tyrosine autophosphorylation sites negatively and positively modulate neu-mediated transformation. *Mol. Cell. Biol.* *17*, 5410–5425.
- Dave, B., Migliaccio, I., Gutierrez, M.C., Wu, M.-F., Chamness, G.C., Wong, H., Narasanna, A., Chakrabarty, A., Hilsenbeck, S.G., Huang, J., et al. (2011). Loss of Phosphatase and Tensin Homolog or Phosphoinositol-3 Kinase Activation and Response to Trastuzumab or Lapatinib in Human Epidermal Growth Factor Receptor 2-Overexpressing Locally Advanced Breast Cancers. *J. Clin. Oncol.* *29*, 166–173.
- D'Costa, A.M., Robinson, J.K., Maududi, T., Chaturvedi, V., Nickoloff, B.J., and Denning, M.F. (2005). The proapoptotic tumor suppressor protein kinase C-δ is lost in human squamous cell carcinomas. *Oncogene* *25*, 378–386.
- De Meyts, P., Roth, J., Neville, D.M., Gavin, J.R., and Lesniak, M.A. (1973). Insulin interactions with its receptors: Experimental evidence for negative cooperativity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *55*, 154–161.
- Debily, M.-A. (2003). Expression and molecular characterization of alternative transcripts of the ARHGEF5/TIM oncogene specific for human breast cancer. *Hum. Mol. Genet.* *13*, 323–334.
- Dephoure, N., Zhou, C., Villén, J., Beausoleil, S.A., Bakalarski, C.E., Elledge, S.J., and Gygi, S.P. (2008). A quantitative atlas of mitotic phosphorylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *105*, 10762.
- Dey, J.H., Bianchi, F., Voshol, J., Bonenfant, D., Oakeley, E.J., and Hynes, N.E. (2010). Targeting Fibroblast Growth Factor Receptors Blocks PI3K/AKT Signaling, Induces Apoptosis, and Impairs Mammary Tumor Outgrowth and Metastasis. *Cancer Res.* *70*, 4151–4162.

- Dibb, N.J., Dilworth, S.M., and Mol, C.D. (2004). Switching on kinases: oncogenic activation of BRAF and the PDGFR family. *Nat. Rev. Cancer* 4, 718–727.
- Dillon, R.L., Brown, S.T., Ling, C., Shioda, T., and Muller, W.J. (2007). An EGR2/CITED1 Transcription Factor Complex and the 14-3-3 σ Tumor Suppressor Are Involved in Regulating ErbB2 Expression in a Transgenic-Mouse Model of Human Breast Cancer. *Mol. Cell. Biol.* 27, 8648–8657.
- Ding, C., Luo, J., Li, L., Li, S., Yang, L., Pan, H., Liu, Q., Qin, H., Chen, C., and Feng, J. (2016). Gab2 facilitates epithelial-to-mesenchymal transition via the MEK/ERK/MMP signaling in colorectal cancer. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 35.
- Dittrich, A., Gautrey, H., Browell, D., and Tyson-Capper, A. (2014). The HER2 Signaling Network in Breast Cancer—Like a Spider in its Web. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* 19, 253–270.
- Dumont, N., and Arteaga, C.L. (2000). Transforming growth factor- β and breast cancer: Tumor promoting effects of transforming growth factor- β . *Breast Cancer Res. BCR* 2, 125.
- Ebisuya, M., Kondoh, K., and Nishida, E. (2005). The duration, magnitude and compartmentalization of ERK MAP kinase activity: mechanisms for providing signaling specificity. *J. Cell Sci.* 118, 2997–3002.
- Eck, M.J., Shoelson, S.E., and Harrison, S.C. (1993). Recognition of a high-affinity phosphotyrosyl peptide by the Src homology-2 domain of p56lck. *Nature* 362, 87–91.
- Eisenberg, A., Biener, E., Charlier, M., Krishnan, R. v., Djiane, J., Herman, B., and Gertler, A. (2004). Transactivation of erbB2 by short and long isoforms of leptin receptors. *FEBS Lett.* 565, 139–142.
- Eminaga, S., and Bennett, A.M. (2008). Noonan Syndrome-associated SHP-2/Ptpn11 Mutants Enhance SIRP and PZR Tyrosyl Phosphorylation and Promote Adhesion-mediated ERK Activation. *J. Biol. Chem.* 283, 15328–15338.
- Erickson, S.L., O’Shea, K.S., Ghaboosi, N., Loverro, L., Frantz, G., Bauer, M., Lu, L.H., and Moore, M.W. (1997). ErbB3 is required for normal cerebellar and cardiac development: a comparison with ErbB2-and heregulin-deficient mice. *Development* 124, 4999–5011.
- Esteva, F.J., Valero, V., Booser, D., Guerra, L.T., Murray, J.L., Pusztai, L., Cristofanilli, M., Arun, B., Esmaeli, B., Fritzsche, H.A., et al. (2002). Phase II Study of Weekly Docetaxel and

Trastuzumab for Patients With HER-2-Overexpressing Metastatic Breast Cancer. *J. Clin. Oncol.* *20*, 1800–1808.

Fath, I., Schweighoffer, F., Rey, I., Multon, M.C., Boiziau, J., Duchesne, M., and Tocque, B. (1994). Cloning of a Grb2 isoform with apoptotic properties. *Science* *264*, 971–974.

Fendly, B.M., Kotts, C., Vetterlein, D., Lewis, G.D., Winget, M., Carver, M.E., Watson, S.R., Sarup, J., Saks, S., and Ullrich, A. (1990). The extracellular domain of HER2/neu is a potential immunogen for active specific immunotherapy of breast cancer. *J. Biol. Response Mod.* *9*, 449–455.

Feng, S., Chen, J.K., Yu, H., Simon, J.A., and Schreiber, S.L. (1994). Two binding orientations for peptides to the Src SH3 domain: development of a general model for SH3-ligand interactions. *Science* *266*, 1241–1247.

Feng, S., Kapoor, T.M., Shirai, F., Combs, A.P., and Schreiber, S.L. (1996). Molecular basis for the binding of SH3 ligands with non-peptide elements identified by combinatorial synthesis. *Chem. Biol.* *3*, 661–670.

Ferguson, K.M., Berger, M.B., Mendrola, J.M., Cho, H.-S., Leahy, D.J., and Lemmon, M.A. (2003). EGF Activates Its Receptor by Removing Interactions that Autoinhibit Ectodomain Dimerization. *Mol. Cell* *11*, 507–517.

Ferrell, J.E. (2000). What Do Scaffold Proteins Really Do? *Sci. Signal.* *2000*, pe1-pe1.

Findlay, G.M., Smith, M.J., Lanner, F., Hsiung, M.S., Gish, G.D., Petsalaki, E., Cockburn, K., Kaneko, T., Huang, H., Bagshaw, R.D., et al. (2013). Interaction Domains of Sos1/Grb2 Are Finely Tuned for Cooperative Control of Embryonic Stem Cell Fate. *Cell* *152*, 1008–1020.

Finkle, D., Quan, Z.R., Asghari, V., Kloss, J., Ghaboosi, N., Mai, E., Wong, W.L., Hollingshead, P., Schwall, R., Koeppen, H., et al. (2004). HER2-Targeted Therapy Reduces Incidence and Progression of Midlife Mammary Tumors in Female Murine Mammary Tumor Virus huHER2-Transgenic Mice. *Clin. Cancer Res.* *10*, 2499–2511.

Fiorio, E., Mercanti, A., Terrasi, M., Micciolo, R., Remo, A., Auriemma, A., Molino, A., Parolin, V., Stefano, B.D., Bonetti, F., et al. (2008). Leptin/HER2 crosstalk in breast cancer: in vitro study and preliminary in vivo analysis. *BMC Cancer* *8*, 305.

Foerster, S., Kacprowski, T., Dhople, V.M., Hammer, E., Herzog, S., Saafan, H., Bien-Möller, S., Albrecht, M., Völker, U., and Ritter, C.A. (2013). Characterization of the EGFR

interactome reveals associated protein complex networks and intracellular receptor dynamics. *PROTEOMICS* 13, 3131–3144.

Fortian, A., and Sorkin, A. (2014). Live-cell fluorescence imaging reveals high stoichiometry of Grb2 binding to the EGF receptor sustained during endocytosis. *J Cell Sci* 127, 432–444.

Furdui, C.M., Lew, E.D., Schlessinger, J., and Anderson, K.S. (2006). Autophosphorylation of FGFR1 Kinase Is Mediated by a Sequential and Precisely Ordered Reaction. *Mol. Cell* 21, 711–717.

Gal, A., Sjöblom, T., Fedorova, L., Imreh, S., Beug, H., and Moustakas, A. (2008). Sustained TGF β exposure suppresses Smad and non-Smad signalling in mammary epithelial cells, leading to EMT and inhibition of growth arrest and apoptosis. *Oncogene* 27, 1218–1230.

Galbaugh, T., Feeney, Y.B., and Clevenger, C.V. (2010). Prolactin Receptor–Integrin Cross-Talk Mediated by SIRP α in Breast Cancer Cells. *Mol. Cancer Res.* 8, 1413–1424.

Gale, N.W., Kaplan, S., Lowenstein, E.J., Schlessinger, J., and Bar-Sagi, D. (1993). Grb2 mediates the EGF-dependent activation of guanine nucleotide exchange on Ras. *Nature* 363, 88–92.

Galisteo, M.L., Chernoff, J., Su, Y.C., Skolnik, E.Y., and Schlessinger, J. (1996). The adaptor protein Nck links receptor tyrosine kinases with the serine-threonine kinase Pak1. *J. Biol. Chem.* 271, 20997–21000.

Galliher, A.J., and Schiemann, W.P. (2007). Src Phosphorylates Tyr284 in TGF- β Type II Receptor and Regulates TGF- β Stimulation of p38 MAPK during Breast Cancer Cell Proliferation and Invasion. *Cancer Res.* 67, 3752–3758.

Galliher-Beckley, A.J., and Schiemann, W.P. (2008). Grb2 binding to Tyr284 in T R-II is essential for mammary tumor growth and metastasis stimulated by TGF-. *Carcinogenesis* 29, 244–251.

Gangopadhyay, S., Nandy, A., Hor, P., and Mukhopadhyay, A. (2013). Breast Cancer Stem Cells: A Novel Therapeutic Target. *Clin. Breast Cancer* 13, 7–15.

Garrett, T.P.J., McKern, N.M., Lou, M., Elleman, T.C., Adams, T.E., Lovrecz, G.O., Zhu, H.-J., Walker, F., Frenkel, M.J., Hoyne, P.A., et al. (2002). Crystal Structure of a Truncated Epidermal Growth Factor Receptor Extracellular Domain Bound to Transforming Growth Factor α . *Cell* 110, 763–773.

- Garrett, T.P.J., McKern, N.M., Lou, M., Elleman, T.C., Adams, T.E., Lovrecz, G.O., Kofler, M., Jorissen, R.N., Nice, E.C., Burgess, A.W., et al. (2003). The Crystal Structure of a Truncated ErbB2 Ectodomain Reveals an Active Conformation, Poised to Interact with Other ErbB Receptors. *Mol. Cell* 11, 495–505.
- Gatza, M.L., Lucas, J.E., Barry, W.T., Kim, J.W., Wang, Q., D. Crawford, M., B. Datto, M., Kelley, M., Mathey-Prevot, B., Potti, A., et al. (2010). A pathway-based classification of human breast cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 107, 6994–6999.
- Gazdar, A.F., Kurvari, V., Virmani, A., Gollahon, L., Sakaguchi, M., Westerfield, M., Kodagoda, D., Stasny, V., Cunningham, H.T., Wistuba, I.I., et al. (1998). Characterization of paired tumor and non-tumor cell lines established from patients with breast cancer. *Int. J. Cancer* 78, 766–774.
- Gennari, R., Menard, S., Fagnoni, F., Ponchio, L., Scelsi, M., Tagliabue, E., Castiglioni, F., Villani, L., Magalotti, C., Gibelli, N., et al. (2004). Pilot Study of the Mechanism of Action of Preoperative Trastuzumab in Patients with Primary Operable Breast Tumors Overexpressing HER2. *Clin. Cancer Res.* 10, 5650–5655.
- Ghatak, S., Misra, S., and Toole, B.P. (2002). Hyaluronan oligosaccharides inhibit anchorage-independent growth of tumor cells by suppressing the phosphoinositide 3-kinase/Akt cell survival pathway. *J. Biol. Chem.* 277, 38013–38020.
- Gilbert, L.C., and Gordon, S.G. (1983). Relationship between cellular procoagulant activity and metastatic capacity of B16 mouse melanoma variants. *Cancer Res.* 43, 536–540.
- Gillet, L.C., Navarro, P., Tate, S., Rost, H., Selevsek, N., Reiter, L., Bonner, R., and Aebersold, R. (2012). Targeted Data Extraction of the MS/MS Spectra Generated by Data-independent Acquisition: A New Concept for Consistent and Accurate Proteome Analysis. *Mol. Cell. Proteomics* 11, O111.016717-O111.016717.
- Giubellino, A., Gao, Y., Lee, S., Lee, M.-J., Vasselli, J.R., Medepalli, S., Trepel, J.B., Burke, T.R., and Bottaro, D.P. (2007). Inhibition of Tumor Metastasis by a Growth Factor Receptor Bound Protein 2 Src Homology 2 Domain–Binding Antagonist. *Cancer Res.* 67, 6012–6016.
- Giubellino, A., Burke, T.R., and Bottaro, D.P. (2008). Grb2 Signaling in Cell Motility and Cancer. *Expert Opin. Ther. Targets* 12, 1021–1033.

- Giuliano, M., Trivedi, M.V., and Schiff, R. (2013). Bidirectional Crosstalk between the Estrogen Receptor and Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Signaling Pathways in Breast Cancer: Molecular Basis and Clinical Implications. *Breast Care* 8, 256–262.
- Goldhirsch, A., Glick, J.H., Gelber, R.D., Coates, A.S., Thürlimann, B., and Senn, H.-J. (2005). Meeting Highlights: International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2005. *Ann. Oncol.* 16, 1569–1583.
- Goldhirsch, A., Coates, A.S., Gelber, R.D., Glick, J.H., Thürlimann, B., and Senn, H.-J. (2006). First—select the target: better choice of adjuvant treatments for breast cancer patients. *Ann. Oncol.* 17, 1772–1776.
- Goldhirsch, A., Wood, W.C., Gelber, R.D., Coates, A.S., Thürlimann, B., and Senn, H.-J. (2007). Progress and promise: highlights of the international expert consensus on the primary therapy of early breast cancer 2007. *Ann. Oncol.* 18, 1133–1144.
- Goldhirsch, A., Wood, W.C., Coates, A.S., Gelber, R.D., Thürlimann, B., and Senn, H.-J. (2011). Strategies for subtypes—dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2011. *Ann. Oncol.* 22, 1736–1747.
- Goudreau, N., Cornille, F., Duchesne, M., Parker, F., Tocqué, B., Garbay, C., and Roques, B.P. (1994). NMR structure of the N-terminal SH3 domain of GRB2 and its complex with a proline-rich peptide from Sos. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 1, 898–907.
- Grabinski, N., Möllmann, K., Milde-Langosch, K., Müller, V., Schumacher, U., Brandt, B., Pantel, K., and Jücker, M. (2014). AKT3 regulates ErbB2, ErbB3 and estrogen receptor α expression and contributes to endocrine therapy resistance of ErbB2+ breast tumor cells from Balb-neuT mice. *Cell. Signal.* 26, 1021–1029.
- Groenestege, W.M.T., Thébault, S., Wijst, J. van der, Berg, D. van den, Janssen, R., Tejpar, S., Heuvel, L.P. van den, Cutsem, E. van, Hoenderop, J.G., Knoers, N.V., et al. (2007). Impaired basolateral sorting of pro-EGF causes isolated recessive renal hypomagnesemia. *J. Clin. Invest.* 117, 2260–2267.
- Gschwind, A., Fischer, O.M., and Ullrich, A. (2004). The discovery of receptor tyrosine kinases: targets for cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer* 4, 361–370.

- Guy, C.T., Webster, M.A., Schaller, M., Parsons, T.J., Cardiff, R.D., and Muller, W.J. (1992). Expression of the neu protooncogene in the mammary epithelium of transgenic mice induces metastatic disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *89*, 10578–10582.
- Guy, P.M., Platko, J.V., Cantley, L.C., Cerione, R.A., Carraway, K.L., and 3rd (1994). Insect cell-expressed p180erbB3 possesses an impaired tyrosine kinase activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *91*, 8132.
- Han, M., and Sternberg, P.W. (1990). let-60, a gene that specifies cell fates during *C. elegans* vulval induction, encodes a ras protein. *Cell* *63*, 921–931.
- Han, W., Carpenter, R.L., Cao, X., and Lo, H.-W. (2013). STAT1 gene expression is enhanced by nuclear EGFR and HER2 via cooperation with STAT3. *Mol. Carcinog.* *52*.
- Hanafusa, H., Torii, S., Yasunaga, T., and Nishida, E. (2002). Sprouty1 and Sprouty2 provide a control mechanism for the Ras/MAPK signalling pathway. *Nat. Cell Biol.* *4*, 850–858.
- Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* *144*, 646–674.
- Hanker, A.B., Pfefferle, A.D., Balko, J.M., Kuba, M.G., Young, C.D., Sanchez, V., Sutton, C.R., Cheng, H., Perou, C.M., Zhao, J.J., et al. (2013). Mutant PIK3CA accelerates HER2-driven transgenic mammary tumors and induces resistance to combinations of anti-HER2 therapies. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *110*, 14372–14377.
- Harari, D., and Yarden, Y. (2000). Molecular mechanisms underlying ErbB2/HER2 action in breast cancer. *Oncogene* *19*, 6102–6114.
- Harvey, A.J., and Crompton, M.R. (2003). Use of RNA interference to validate Brk as a novel therapeutic target in breast cancer: Brk promotes breast carcinoma cell proliferation. *Oncogene* *22*, 5006–5010.
- Hatada, M.H., Lu, X., Laird, E.R., Green, J., Morgenstern, J.P., Lou, M., Marr, C.S., Phillips, T.B., Ram, M.K., Theriault, K., et al. (1995). Molecular basis for interaction of the protein tyrosine kinase ZAP-70 with the T-cell receptor. *Nature* *377*, 32–38.
- Hein, M.Y., Hubner, N.C., Poser, I., Cox, J., Nagaraj, N., Toyoda, Y., Gak, I.A., Weisswange, I., Mansfeld, J., Buchholz, F., et al. (2015). A Human Interactome in Three Quantitative Dimensions Organized by Stoichiometries and Abundances. *Cell* *163*, 712–723.

- Hermeking, H., Lengauer, C., Polyak, K., He, T.-C., Zhang, L., Thiagalingam, S., Kinzler, K.W., and Vogelstein, B. (1997). 14-3-3 σ Is a p53-Regulated Inhibitor of G2/M Progression. *Mol. Cell* 1, 3–11.
- Herschkowitz, J.I., Simin, K., Weigman, V.J., Mikaelian, I., Usary, J., Hu, Z., Rasmussen, K.E., Jones, L.P., Assefnia, S., Chandrasekharan, S., et al. (2007). Identification of conserved gene expression features between murine mammary carcinoma models and human breast tumors. *Genome Biol.* 8, R76.
- Higa, G.M., and Abraham, J. (2007). Lapatinib in the treatment of breast cancer. *Expert Rev. Anticancer Ther.* 7, 1183–1192.
- Hof, P., Pluskey, S., Dhe-Paganon, S., Eck, M.J., and Shoelson, S.E. (1998). Crystal Structure of the Tyrosine Phosphatase SHP-2. *Cell* 92, 441–450.
- Holgado-Madruga, M., Emlet, D.R., Moscatello, D.K., Godwin, A.K., and Wong, A.J. (1996). A Grb2-associated docking protein in EGF- and insulin-receptor signalling. *Nature* 379, 560–564.
- Hou, J., Zhou, Z., Chen, X., Zhao, R., Yang, Z., Wei, N., Ni, Q., Feng, Y., Yu, X., Ma, J., et al. (2016). HER2 reduces breast cancer radiosensitivity by activating focal adhesion kinase in vitro and in vivo. *Oncotarget* 7, 45186–45198.
- Houtman, J.C.D., Higashimoto, Y., Dimasi, N., Cho, S., Yamaguchi, H., Bowden, B., Regan, C., Malchiodi, E.L., Mariuzza, R., Schuck, P., et al. (2004). Binding specificity of multiprotein signaling complexes is determined by both cooperative interactions and affinity preferences. *Biochemistry (Mosc.)* 43, 4170–4178.
- Hovey, R.C., McFadden, T.B., and Akers, R.M. (1999). Regulation of mammary gland growth and morphogenesis by the mammary fat pad: a species comparison. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* 4, 53–68.
- Hu, P., Feng, J., Zhou, T., Wang, J., Jing, B., Yu, M., Hu, M., Zhang, X., Shen, B., and Guo, N. (2005). In vivo identification of the interaction site of ErbB2 extracellular domain with its autoinhibitor. *J. Cell. Physiol.* 205, 335–343.
- Hu, Q., Guo, C., Li, Y., Aronow, B.J., and Zhang, J. (2011). LMO7 Mediates Cell-Specific Activation of the Rho-Myocardin-Related Transcription Factor-Serum Response Factor Pathway and Plays an Important Role in Breast Cancer Cell Migration. *Mol. Cell. Biol.* 31, 3223–3240.

- Huang, F. (2005). Growth Factor Receptor Binding Protein 2-mediated Recruitment of the RING Domain of Cbl to the Epidermal Growth Factor Receptor Is Essential and Sufficient to Support Receptor Endocytosis. *Mol. Biol. Cell* *16*, 1268–1281.
- Huang, F., and Sorkin, A. (2005). Growth factor receptor binding protein 2-mediated recruitment of the RING domain of Cbl to the epidermal growth factor receptor is essential and sufficient to support receptor endocytosis. *Mol. Biol. Cell* *16*, 1268–1281.
- Huang, L., Ren, J., Chen, D., Li, Y., Kharbanda, S., and Kufe, D. (2003). MUC1 cytoplasmic domain coactivates Wnt target gene transcription and confers transformation. *Cancer Biol. Ther.* *2*, 702–706.
- Hurwitz, E., Stancovski, I., Sela, M., and Yarden, Y. (1995). Suppression and promotion of tumor growth by monoclonal antibodies to ErbB-2 differentially correlate with cellular uptake. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *92*, 3353–3357.
- Huse, M., and Kuriyan, J. (2002). The conformational plasticity of protein kinases. *Cell* *109*, 275–282.
- Ideker, T., and Krogan, N.J. (2012). Differential network biology. *Mol. Syst. Biol.* *8*.
- Ikeda, O., Sekine, Y., Mizushima, A., Nakasuji, M., Miyasaka, Y., Yamamoto, C., Muromoto, R., Nanbo, A., Oritani, K., Yoshimura, A., et al. (2010). Interactions of STAP-2 with Brk and STAT3 Participate in Cell Growth of Human Breast Cancer Cells. *J. Biol. Chem.* *285*, 38093–38103.
- Ikeda, O., Mizushima, A., Sekine, Y., Yamamoto, C., Muromoto, R., Nanbo, A., Oritani, K., Yoshimura, A., and Matsuda, T. (2011). Involvement of STAP-2 in Brk-mediated phosphorylation and activation of STAT5 in breast cancer cells. *Cancer Sci.* *102*, 756–761.
- Issa, A., Gill, J.W., Heideman, M.R., Sahin, O., Wiemann, S., Dey, J.H., and Hynes, N.E. (2013). Combinatorial targeting of FGF and ErbB receptors blocks growth and metastatic spread of breast cancer models. *Breast Cancer Res. BCR* *15*, R8.
- Ito, N., Wernstedt, C., Engström, U., and Claesson-Welsh, L. (1998). Identification of Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-1 Tyrosine Phosphorylation Sites and Binding of SH2 Domain-containing Molecules. *J. Biol. Chem.* *273*, 23410–23418.
- Iwata, T., Tanaka, K., Tahara, T., Nozaki, S., Onoe, H., Watanabe, Y., and Fukase, K. (2013). A conformationally fixed analog of the peptide mimic Grb2–SH2 domain: synthesis and evaluation against the A431 cancer cell. *Mol. Biosyst.* *9*, 1019.

- Izumchenko, E., Chang, X., Michailidi, C., Kagohara, L., Ravi, R., Paz, K., Brait, M., Hoque, M.O., Ling, S., Bedi, A., et al. (2014). The TGF β -miR200-MIG6 Pathway Orchestrates the EMT-Associated Kinase Switch That Induces Resistance to EGFR Inhibitors. *Cancer Res.* *74*, 3995–4005.
- Izumi, Y., Xu, L., di Tomaso, E., Fukumura, D., and Jain, R.K. (2002). Tumour biology: Herceptin acts as an anti-angiogenic cocktail. *Nature* *416*, 279–280.
- Jackisch, C., Lammers, P., and Jacobs, I. (2017). Evolving landscape of human epidermal growth factor receptor 2-positive breast cancer treatment and the future of biosimilars. *The Breast* *32*, 199–216.
- Jackson-Fisher, A.J., Bellinger, G., Ramabhadran, R., Morris, J.K., Lee, K.-F., and Stern, D.F. (2004). ErbB2 is required for ductal morphogenesis of the mammary gland. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *101*, 17138–17143.
- Jia, D., Jing, Y., Zhang, Z., Liu, L., Ding, J., Zhao, F., Ge, C., Wang, Q., Chen, T., Yao, M., et al. (2014). Amplification of MPZL1/PZR promotes tumor cell migration through Src-mediated phosphorylation of cortactin in hepatocellular carcinoma. *Cell Res.* *24*, 204–217.
- Jiang, X. (2003). Grb2 Regulates Internalization of EGF Receptors through Clathrin-coated Pits. *Mol. Biol. Cell* *14*, 858–870.
- Jiang, Z., Georgel, P., Li, C., Choe, J., Crozat, K., Rutschmann, S., Du, X., Bigby, T., Mudd, S., Sovath, S., et al. (2006). Details of Toll-like receptor:adapter interaction revealed by germ-line mutagenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *103*, 10961–10966.
- Jura, N., Endres, N.F., Engel, K., Deindl, S., Das, R., Lamers, M.H., Wemmer, D.E., Zhang, X., and Kuriyan, J. (2009). Mechanism for Activation of the EGF Receptor Catalytic Domain by the Juxtamembrane Segment. *Cell* *137*, 1293–1307.
- Kamalati, T., Jolin, H.E., Mitchell, P.J., Barker, K.T., Jackson, L.E., Dean, C.J., Page, M.J., Gusterson, B.A., and Crompton, M.R. (1996). Brk, a Breast Tumor-derived Non-receptor Protein-tyrosine Kinase, Sensitizes Mammary Epithelial Cells to Epidermal Growth Factor. *J. Biol. Chem.* *271*, 30956–30963.
- Kamalati, T., Jolin, H.E., Fry, M.J., and Crompton, M.R. (2000). Expression of the BRK tyrosine kinase in mammary epithelial cells enhances the coupling of EGF signalling to PI 3-kinase and Akt, via erbB3 phosphorylation. *Oncogene* *19*, 5471–5476.

- Kanai, Y., Ochiai, A., Shibata, T., Oyama, T., Ushijima, S., Akimoto, S., and Hirohashi, S. (1995). c-erbB-2 gene product directly associates with beta-catenin and plakoglobin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *208*, 1067–1072.
- Kasza, A. (2013). Signal-dependent Elk-1 target genes involved in transcript processing and cell migration. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gene Regul. Mech.* *1829*, 1026–1033.
- Kauraniemi, P., Kuukasjärvi, T., Sauter, G., and Kallioniemi, A. (2003). Amplification of a 280-Kilobase Core Region at the ERBB2 Locus Leads to Activation of Two Hypothetical Proteins in Breast Cancer. *Am. J. Pathol.* *163*, 1979.
- Kawamoto, T., Sato, J.D., Le, A., Polikoff, J., Sato, G.H., and Mendelsohn, J. (1983). Growth stimulation of A431 cells by epidermal growth factor: identification of high-affinity receptors for epidermal growth factor by an anti-receptor monoclonal antibody. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *80*, 1337.
- Khoury, H., Dankort, D.L., Sadekova, S., Naujokas, M.A., Muller, W.J., and Park, M. (2001). Distinct tyrosine autophosphorylation sites mediate induction of epithelial mesenchymal like transition by an activated ErbB-2/Neu receptor. *Oncogene* *20*, 788–799.
- King, C.R., Kraus, M.H., and Aaronson, S.A. (1985). Amplification of a novel v-erbB-related gene in a human mammary carcinoma. *Science* *229*, 974–976.
- Kinlough, C.L., Poland, P.A., Bruns, J.B., Harkleroad, K.L., and Hughey, R.P. (2004). MUC1 Membrane Trafficking Is Modulated by Multiple Interactions. *J. Biol. Chem.* *279*, 53071–53077.
- Klapper, L.N., Glathe, S., Vaisman, N., Hynes, N.E., Andrews, G.C., Sela, M., and Yarden, Y. (1999). The ErbB-2/HER2 oncprotein of human carcinomas may function solely as a shared coreceptor for multiple stroma-derived growth factors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *96*, 4995–5000.
- Klapper, L.N., Waterman, H., Sela, M., and Yarden, Y. (2000). Tumor-inhibitory Antibodies to HER-2/ErbB-2 May Act by Recruiting c-Cbl and Enhancing Ubiquitination of HER-2. *Cancer Res.* *60*, 3384–3388.
- Klint, P., Kanda, S., and Claesson-Welsh, L. (1995). Shc and a novel 89-kDa component couple to the Grb2-Sos complex in fibroblast growth factor-2-stimulated cells. *J. Biol. Chem.* *270*, 23337–23344.

- Klos, K.S., Wyszomierski, S.L., Sun, M., Tan, M., Zhou, X., Li, P., Yang, W., Yin, G., Hittelman, W.N., and Yu, D. (2006). ErbB2 Increases Vascular Endothelial Growth Factor Protein Synthesis via Activation of Mammalian Target of Rapamycin/p70S6K Leading to Increased Angiogenesis and Spontaneous Metastasis of Human Breast Cancer Cells. *Cancer Res.* *66*, 2028–2037.
- Knight, J.D.R., Choi, H., Gupta, G.D., Pelletier, L., Raught, B., Nesvizhskii, A.I., and Gingras, A.-C. (2017). ProHits-viz: a suite of web tools for visualizing interaction proteomics data. *Nat. Methods* *14*, 645.
- Knowles, P.P., Murray-Rust, J., Kjær, S., Scott, R.P., Hanrahan, S., Santoro, M., Ibáñez, C.F., and McDonald, N.Q. (2006). Structure and Chemical Inhibition of the RET Tyrosine Kinase Domain. *J. Biol. Chem.* *281*, 33577–33587.
- Ko, S., Kim, J.Y., Jeong, J., Lee, J.E., Yang, W.I., and Jung, W.H. (2014). The Role and Regulatory Mechanism of 14-3-3 Sigma in Human Breast Cancer. *J. Breast Cancer* *17*, 207–218.
- Koch, C.A., Anderson, D., Moran, M.F., Ellis, C., and Pawson, T. (1991). SH2 and SH3 domains: elements that control interactions of cytoplasmic signaling proteins. *Science* *252*, 668–674.
- Konecny, G., Pauletti, G., Pegram, M., Untch, M., Dandekar, S., Aguilar, Z., Wilson, C., Rong, H.-M., Bauerfeind, I., Felber, M., et al. (2003). Quantitative Association Between HER-2/neu and Steroid Hormone Receptors in Hormone Receptor-Positive Primary Breast Cancer. *JNCI J. Natl. Cancer Inst.* *95*, 142–153.
- Koromilas, A.E., and Sexl, V. (2013). The tumor suppressor function of STAT1 in breast cancer. *JAK-STAT* *2*, e23353.
- Kouhara, H., Hadari, Y.R., Spivak-Kroizman, T., Schilling, J., Bar-Sagi, D., Lax, I., and Schlessinger, J. (1997). A lipid-anchored Grb2-binding protein that links FGF-receptor activation to the Ras/MAPK signaling pathway. *Cell* *89*, 693–702.
- Krop, I.E., LoRusso, P., Miller, K.D., Modi, S., Yardley, D., Rodriguez, G., Guardino, E., Lu, M., Zheng, M., Girish, S., et al. (2012). A Phase II Study of Trastuzumab Emtansine in Patients With Human Epidermal Growth Factor Receptor 2-Positive Metastatic Breast Cancer Who Were Previously Treated With Trastuzumab, Lapatinib, an Anthracycline, a Taxane, and Capecitabine. *J. Clin. Oncol.* *30*, 3234–3241.

- Kufe, D.W. (2013). MUC1-C oncoprotein as a target in breast cancer: activation of signaling pathways and therapeutic approaches. *Oncogene* *32*, 1073–1081.
- Kumeta, M., Gilmore, J.L., Umeshima, H., Ishikawa, M., Kitajiri, S., Horigome, T., Kengaku, M., and Takeyasu, K. (2014). Caprice/MISP is a novel F-actin bundling protein critical for actin-based cytoskeletal reorganizations. *Genes Cells* *19*, 338–349.
- Kuriyan, J., and Cowburn, D. (1997). Modular peptide recognition domains in eukaryotic signaling. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* *26*, 259–288.
- Kusano, K., Thomas, T.N., and Fujiwara, K. (2008). Phosphorylation and Localization of Protein-Zero Related (PZR) in Cultured Endothelial Cells. *Endothelium* *15*, 127–136.
- Kwong, K.Y., and Hung, M.-C. (1998). A novel splice variant of HER2 with increased transformation activity. *Mol. Carcinog.* *23*, 62–68.
- Lambert, J.-P., Ivosev, G., Couzens, A.L., Larsen, B., Taipale, M., Lin, Z.-Y., Zhong, Q., Lindquist, S., Vidal, M., Aebersold, R., et al. (2013). Mapping differential interactomes by affinity purification coupled with data-independent mass spectrometry acquisition. *Nat. Methods* *10*, 1239–1245.
- Lapin, V., Shirdel, E.A., Wei, X., Mason, J.M., Jurisica, I., and Mak, T.W. (2014). Kinome-wide screening of HER2+ breast cancer cells for molecules that mediate cell proliferation or sensitize cells to trastuzumab therapy. *Oncogenesis* *3*, e133.
- Lazar, G.A., Dang, W., Karki, S., Vafa, O., Peng, J.S., Hyun, L., Chan, C., Chung, H.S., Eivazi, A., Yoder, S.C., et al. (2006). Engineered antibody Fc variants with enhanced effector function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *103*, 4005–4010.
- Le, X.-F., Claret, F.-X., Lammayot, A., Tian, L., Deshpande, D., LaPushin, R., Tari, A.M., and Bast, R.C. (2003). The Role of Cyclin-dependent Kinase Inhibitor p27Kip1 in Anti-HER2 Antibody-induced G1 Cell Cycle Arrest and Tumor Growth Inhibition. *J. Biol. Chem.* *278*, 23441–23450.
- Le, X.-F., Lammayot, A., Gold, D., Lu, Y., Mao, W., Chang, T., Patel, A., Mills, G.B., and Bast, R.C. (2005). Genes Affecting the Cell Cycle, Growth, Maintenance, and Drug Sensitivity Are Preferentially Regulated by Anti-HER2 Antibody through Phosphatidylinositol 3-Kinase-AKT Signaling. *J. Biol. Chem.* *280*, 2092–2104.

- Lee, J.W., Soung, Y.H., Seo, S.H., Kim, S.Y., Park, C.H., Wang, Y.P., Park, K., Nam, S.W., Park, W.S., Kim, S.H., et al. (2006). Somatic Mutations of ERBB2 Kinase Domain in Gastric, Colorectal, and Breast Carcinomas. *Clin. Cancer Res.* *12*, 57–61.
- Lee, K.-F., Simon, H., Chen, H., Bates, B., Hung, M.-C., and Hauser, C. (1995). Requirement for neuregulin receptor erbB2 in neural and cardiac development. *Nature* *378*, 394–398.
- Lee, Y.-Y., Do, I.-G., Park, Y.A., Choi, J.-J., Song, S.Y., Kim, C.J., Kim, M.K., Song, T.J., Park, H.S., Choi, C.H., et al. (2010). Low dynamin 2 expression is associated with tumor invasion and metastasis in invasive squamous cell carcinoma of cervix. *Cancer Biol. Ther.* *10*, 329–335.
- Lee-Hoeftlich, S.T., Crocker, L., Yao, E., Pham, T., Munroe, X., Hoeftlich, K.P., Sliwkowski, M.X., and Stern, H.M. (2008). A Central Role for HER3 in HER2-Amplified Breast Cancer: Implications for Targeted Therapy. *Cancer Res.* *68*, 5878–5887.
- Lemke, G., and Axel, R. (1985). Isolation and sequence of a cDNA encoding the major structural protein of peripheral myelin. *Cell* *40*, 501–508.
- Lemmon, M.A., and Schlessinger, J. (2010). Cell Signaling by Receptor Tyrosine Kinases. *Cell* *141*, 1117–1134.
- Lev, S., Halevy, D.B., Peretti, D., and Dahan, N. (2008). The VAP protein family: from cellular functions to motor neuron disease. *Trends Cell Biol.* *18*, 282–290.
- Levi-Montalcini, R. (1952). Effects of Mouse Tumor Transplantation on the Nervous System. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *55*, 330–344.
- Lewis, G.D., Figari, I., Fendly, B., Wong, W.L., Carter, P., Gorman, C., and Shepard, H.M. (1993). Differential responses of human tumor cell lines to anti-p185HER2 monoclonal antibodies. *Cancer Immunol. Immunother.* *37*, 255–263.
- Lewitzky, M., Kardinal, C., Gehring, N.H., Schmidt, E.K., Konkol, B., Eulitz, M., Birchmeier, W., Schaeper, U., and Feller, S.M. (2001). The C-terminal SH3 domain of the adapter protein Grb2 binds with high affinity to sequences in Gab1 and SLP-76 which lack the SH3-typical P-x-x-P core motif. *Oncogene* *20*, 1052–1062.
- Li, H., Shao, B., Yan, Y., Song, G., Liu, X., Wang, J., and Liang, X. (2016). Efficacy and safety of trastuzumab combined with chemotherapy for first-line treatment and beyond progression of HER2-overexpressing advanced breast cancer. *Chin. J. Cancer Res.* *28*, 330–338.

- Li, J., Bennett, K., Stukalov, A., Fang, B., Zhang, G., Yoshida, T., Okamoto, I., Kim, J.-Y., Song, L., Bai, Y., et al. (2013). Perturbation of the mutated EGFR interactome identifies vulnerabilities and resistance mechanisms. *Mol. Syst. Biol.* *9*, 705.
- Li, J., Bennett, K., Stukalov, A., Fang, B., Zhang, G., Yoshida, T., Okamoto, I., Kim, J.-Y., Song, L., Bai, Y., et al. (2014a). Perturbation of the mutated EGFR interactome identifies vulnerabilities and resistance mechanisms. *Mol. Syst. Biol.* *9*, 705–705.
- Li, N., Batzer, A., Daly, R., Yajnik, V., Skolnik, E., Chardin, P., Bar-Sagi, D., Margolis, B., and Schlessinger, J. (1993). Guanine-nucleotide-releasing factor hSos1 binds to Grb2 and links receptor tyrosine kinases to Ras signalling. *Nature* *363*, 85–88.
- Li, N., Lorinczi, M., Ireton, K., and Elferink, L.A. (2007). Specific Grb2-mediated Interactions Regulate Clathrin-dependent Endocytosis of the cMet-tyrosine Kinase. *J. Biol. Chem.* *282*, 16764–16775.
- Li, P., Banjade, S., Cheng, H.-C., Kim, S., Chen, B., Guo, L., Llaguno, M., Hollingsworth, J.V., King, D.S., Banani, S.F., et al. (2012). Phase Transitions in the Assembly of Multi-Valent Signaling Proteins. *Nature* *483*, 336–340.
- Li, S., Couvillon, A.D., Brasher, B.B., and Van Etten, R.A. (2001). Tyrosine phosphorylation of Grb2 by Bcr/Abl and epidermal growth factor receptor: a novel regulatory mechanism for tyrosine kinase signaling. *EMBO J.* *20*, 6793–6804.
- Li, T., Guo, H., Song, Y., Zhao, X., Shi, Y., Lu, Y., Hu, S., Nie, Y., Fan, D., and Wu, K. (2014b). Loss of vinculin and membrane-bound β -catenin promotes metastasis and predicts poor prognosis in colorectal cancer. *Mol. Cancer* *13*, 263.
- Li, Y., Yu, W., Ren, J., Chen, W., Huang, L., Kharbanda, S., Loda, M., and Kufe, D. (2003). Heregulin Targets γ -Catenin to the Nucleolus by a Mechanism Dependent on the DF3/MUC1 Oncoprotein¹ National Cancer Institute grant CA97098. Note: Y.L. and W.-h.Y. contributed equally to this work. *Mol. Cancer Res.* *1*, 765–775.
- Li, Y.M., Pan, Y., Wei, Y., Cheng, X., Zhou, B.P., Tan, M., Zhou, X., Xia, W., Hortobagyi, G.N., Yu, D., et al. (2004). Upregulation of CXCR4 is essential for HER2-mediated tumor metastasis. *Cancer Cell* *6*, 459–469.
- Lim, W.A. (2002). The modular logic of signaling proteins: building allosteric switches from simple binding domains. *Curr. Opin. Struct. Biol.* *12*, 61–68.

- Lim, W.A., and Pawson, T. (2010). Phosphotyrosine Signaling: Evolving a New Cellular Communication System. *Cell* *142*, 661–667.
- Lim, W.A., Richards, F.M., and Fox, R.O. (1994a). Structural determinants of peptide-binding orientation and of sequence specificity in SH3 domains. *Nature* *372*, 375–379.
- Lim, W.A., Fox, R.O., and Richards, F.M. (1994b). Stability and peptide binding affinity of an SH3 domain from the *Caenorhabditis elegans* signaling protein Sem-5. *Protein Sci.* *3*, 1261–1266.
- Lin, C.-C., Melo, F.A., Ghosh, R., Suen, K.M., Stagg, L.J., Kirkpatrick, J., Arold, S.T., Ahmed, Z., and Ladbury, J.E. (2012). Inhibition of Basal FGF Receptor Signaling by Dimeric Grb2. *Cell* *149*, 1514–1524.
- Lin, E.Y., Jones, J.G., Li, P., Zhu, L., Whitney, K.D., Muller, W.J., and Pollard, J.W. (2003). Progression to Malignancy in the Polyoma Middle T Oncoprotein Mouse Breast Cancer Model Provides a Reliable Model for Human Diseases. *Am. J. Pathol.* *163*, 2113–2126.
- Liu, B.A., Jablonowski, K., Shah, E.E., Engelmann, B.W., Jones, R.B., and Nash, P.D. (2010). SH2 Domains Recognize Contextual Peptide Sequence Information to Determine Selectivity. *Mol. Cell. Proteomics* *9*, 2391–2404.
- Liu, B.A., Engelmann, B.W., and Nash, P.D. (2012). The language of SH2 domain interactions defines phosphotyrosine-mediated signal transduction. *FEBS Lett.* *586*, 2597–2605.
- Liu, C.-Y., Lin, H.-H., Tang, M.-J., and Wang, Y.-K. (2015). Vimentin contributes to epithelial-mesenchymal transition cancer cell mechanics by mediating cytoskeletal organization and focal adhesion maturation. *Oncotarget* *6*, 15966–15983.
- Lock, L.S., Royal, I., Naujokas, M.A., and Park, M. (2000). Identification of an Atypical Grb2 Carboxyl-terminal SH3 Domain Binding Site in Gab Docking Proteins Reveals Grb2-dependent and -independent Recruitment of Gab1 to Receptor Tyrosine Kinases. *J. Biol. Chem.* *275*, 31536–31545.
- Lodygin, D., and Hermeking, H. (2005). The role of epigenetic inactivation of 14-3-3|[sigma]| in human cancer. *Cell Res.* *15*, 237–246.
- Loetsch, D., Steiner, E., Holzmann, K., Spiegl-Kreinecker, S., Pirker, C., Hlavaty, J., Petznek, H., Hegedus, B., Garay, T., Mohr, T., et al. (2013). Major vault protein supports

glioblastoma survival and migration by upregulating the EGFR/PI3K signalling axis. *Oncotarget* 4, 1904–1918.

Lowenstein, E.J., Daly, R.J., Batzer, A.G., Li, W., Margolis, B., Lammers, R., Ullrich, A., Skolnik, E.Y., Bar-Sagi, D., and Schlessinger, J. (1992). The SH2 and SH3 domain-containing protein GRB2 links receptor tyrosine kinases to ras signaling. *Cell* 70, 431–442.

Lu, Z., Hornia, A., Jiang, Y.W., Zang, Q., Ohno, S., and Foster, D.A. (1997). Tumor promotion by depleting cells of protein kinase C delta. *Mol. Cell. Biol.* 17, 3418.

Luttrell, L.M., Daaka, Y., Della Rocca, G.J., and Lefkowitz, R.J. (1997). G protein-coupled receptors mediate two functionally distinct pathways of tyrosine phosphorylation in rat 1a fibroblasts. Shc phosphorylation and receptor endocytosis correlate with activation of Erk kinases. *J. Biol. Chem.* 272, 31648–31656.

Macdonald-Obermann, J.L., Piwnica-Worms, D., and Pike, L.J. (2012). Mechanics of EGF Receptor/ErbB2 kinase activation revealed by luciferase fragment complementation imaging. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 109, 137–142.

Maier, B., Kirsch, M., Anderhub, S., Zentgraf, H., and Krämer, A. (2013). The novel actin/focal adhesion-associated protein MISP is involved in mitotic spindle positioning in human cells. *Cell Cycle* 12, 1457–1471.

Maina, F., Casagranda, F., Audero, E., Simeone, A., Comoglio, P.M., Klein, R., and Ponzetto, C. (1996). Uncoupling of Grb2 from the Met receptor in vivo reveals complex roles in muscle development. *Cell* 87, 531–542.

Malhotra, G.K., Zhao, X., Band, H., and Band, V. (2010). Histological, molecular and functional subtypes of breast cancers. *Cancer Biol. Ther.* 10, 955–960.

Marengere, L.E.M., Songyang, Z., Gish, G.D., Schaller, M.D., Parsons, J.T., Stern, M.J., Cantley, L.C., and Pawson, T. (1994). SH2 domain specificity and activity modified by a single residue. *Nature* 369, 502–505.

Margolis, B., Li, N., Koch, A., Mohammadi, M., Hurwitz, D.R., Zilberstein, A., Ullrich, A., Pawson, T., and Schlessinger, J. (1990). The tyrosine phosphorylated carboxyterminus of the EGF receptor is a binding site for GAP and PLC-gamma. *EMBO J.* 9, 4375–4380.

Martinez-Martin, N., Ramani, S.R., Hackney, J.A., Tom, I., Wranik, B.J., Chan, M., Wu, J., Paluch, M.T., Takeda, K., Hass, P.E., et al. (2016). The extracellular interactome of the

- human adenovirus family reveals diverse strategies for immunomodulation. *Nat. Commun.* 7, 11473.
- Martinu, L., Santiago-Walker, A., Qi, H., and Chou, M.M. (2002). Endocytosis of Epidermal Growth Factor Receptor Regulated by Grb2-mediated Recruitment of the Rab5 GTPase-activating Protein RN-tre. *J. Biol. Chem.* 277, 50996–51002.
- Masszi, A., Fan, L., Rosivall, L., McCulloch, C.A., Rotstein, O.D., Mucsi, I., and Kapus, A. (2004). Integrity of Cell-Cell Contacts Is a Critical Regulator of TGF- β 1-Induced Epithelial-to-Myofibroblast Transition. *Am. J. Pathol.* 165, 1955–1967.
- Masuda, H., Zhang, D., Bartholomeusz, C., Doihara, H., Hortobagyi, G.N., and Ueno, N.T. (2012). Role of epidermal growth factor receptor in breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* 136, 331–345.
- Matsuda, M., Mayer, B.J., Fukui, Y., and Hanafusa, H. (1990). Binding of transforming protein, P47gag-crk, to a broad range of phosphotyrosine-containing proteins. *Science* 248, 1537–1539.
- Matuoka, K., Shibata, M., Yamakawa, A., and Takenawa, T. (1992). Cloning of ASH, a ubiquitous protein composed of one Src homology region (SH) 2 and two SH3 domains, from human and rat cDNA libraries. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89, 9015–9019.
- Matuoka, K., Shibusaki, F., Shibata, M., and Takenawa, T. (1993). Ash/Grb-2, a SH2/S3H3-containing protein, couples to signaling for mitogenesis and cytoskeletal reorganization by EGF and PDGF. *EMBO J.* 12, 3467.
- Mayer, B.J., and Baltimore, D. (1993). Signalling through SH2 and SH3 domains. *Trends Cell Biol.* 3, 8–13.
- Mayer, B.J., and Hanafusa, H. (1990). Association of the v-crk oncogene product with phosphotyrosine-containing proteins and protein kinase activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 87, 2638–2642.
- Mayer, B.J., Hamaguchi, M., and Hanafusa, H. (1988). A novel viral oncogene with structural similarity to phospholipase C. *Nature* 332, 272–275.
- McDonald, C.B., Seldeen, K.L., Deegan, B.J., and Farooq, A. (2008a). Structural basis of the differential binding of the SH3 domains of Grb2 adaptor to the guanine nucleotide exchange factor Sos1. *Arch. Biochem. Biophys.* 479, 52–62.

- McDonald, C.B., Seldeen, K.L., Deegan, B.J., Lewis, M.S., and Farooq, A. (2008b). Grb2 adaptor undergoes conformational change upon dimerization. *Arch. Biochem. Biophys.* *475*, 25–35.
- McDonald, C.B., Seldeen, K.L., Deegan, B.J., and Farooq, A. (2009). SH3 Domains of Grb2 Adaptor Bind to PX ψ PXR Motifs Within the Sos1 Nucleotide Exchange Factor in a Discriminate Manner. *Biochemistry (Mosc.)* *48*, 4074–4085.
- McDonald, C.B., Bhat, V., Mikles, D.C., Deegan, B.J., Seldeen, K.L., and Farooq, A. (2012). Bivalent binding drives the formation of the Grb2-Gab1 signaling complex in a noncooperative manner: Assembly of Grb2-Gab1 signaling complex. *FEBS J.* *279*, 2156–2173.
- McDonald, C.B., El Hokayem, J., Zafar, N., Balke, J.E., Bhat, V., Mikles, D.C., Deegan, B.J., Seldeen, K.L., and Farooq, A. (2013). Allostery mediates ligand binding to Grb2 adaptor in a mutually exclusive manner: ALLOSTERIC CONTROL OF LIGAND BINDING TO GRB2 ADAPTOR. *J. Mol. Recognit.* *26*, 92–103.
- McKiernan, E., O'Brien, K., Grebenchtchikov, N., Geurts-Moespot, A., Sieuwerts, A.M., Martens, J.W.M., Magdolen, V., Evoy, D., McDermott, E., Crown, J., et al. (2008). Protein kinase C δ expression in breast cancer as measured by real-time PCR, western blotting and ELISA. *Br. J. Cancer* *99*, 1644–1650.
- Meisenhelder, J., Suh, P.-G., Rhee, S.G., and Hunter, T. (1989). Phospholipase C- γ is a substrate for the PDGF and EGF receptor protein-tyrosine kinases in vivo and in vitro. *Cell* *57*, 1109–1122.
- Mellacheruvu, D., Wright, Z., Couzens, A.L., Lambert, J.-P., St-Denis, N.A., Li, T., Miteva, Y.V., Hauri, S., Sardiu, M.E., Low, T.Y., et al. (2013). The CRAPome: a contaminant repository for affinity purification-mass spectrometry data. *Nat. Methods* *10*, 730–736.
- Micalizzi, D.S., Farabaugh, S.M., and Ford, H.L. (2010). Epithelial-Mesenchymal Transition in Cancer: Parallels Between Normal Development and Tumor Progression. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* *15*, 117–134.
- Minoo, P., Chughtai, N., Campiglio, M., Stein-Gerlach, M., Lebrun, J.-J., Ullrich, A., and Ali, S. (2003). The adaptor function of SHP-2 downstream of the prolactin receptor is required for the recruitment of p29, a substrate of SHP-2. *Cell. Signal.* *15*, 319–326.

- Mitchell, P.J., Sara, E.A., and Crompton, M.R. (2000). A novel adaptor-like protein which is a substrate for the non-receptor tyrosine kinase, BRK. *Oncogene* *19*, 4273–4282.
- Mitra, D., Brumlik, M.J., Okamgba, S.U., Zhu, Y., Duplessis, T.T., Parvani, J.G., Lesko, S.M., Brogi, E., and Jones, F.E. (2009). An oncogenic isoform of HER2 associated with locally disseminated breast cancer and trastuzumab resistance. *Mol. Cancer Ther.* *8*, 2152–2162.
- Mohammadi, M., Schlessinger, J., and Hubbard, S.R. (1996). Structure of the FGF Receptor Tyrosine Kinase Domain Reveals a Novel Autoinhibitory Mechanism. *Cell* *86*, 577–587.
- Mol, C.D., Dougan, D.R., Schneider, T.R., Skene, R.J., Kraus, M.L., Scheibe, D.N., Snell, G.P., Zou, H., Sang, B.-C., and Wilson, K.P. (2004). Structural Basis for the Autoinhibition and STI-571 Inhibition of c-Kit Tyrosine Kinase. *J. Biol. Chem.* *279*, 31655–31663.
- Molina, M.A., Codony-Servat, J., Albanell, J., Rojo, F., Arribas, J., and Baselga, J. (2001). Trastuzumab (Herceptin), a Humanized Anti-HER2 Receptor Monoclonal Antibody, Inhibits Basal and Activated HER2 Ectodomain Cleavage in Breast Cancer Cells. *Cancer Res.* *61*, 4744–4749.
- Molloy, C.J., Bottaro, D.P., Fleming, T.P., Marshall, M.S., Gibbs, J.B., and Aaronson, S.A. (1989). PDGF induction of tyrosine phosphorylation of GTPase activating protein. *Nature* *342*, 711–714.
- Moody, S.E., Sarkisian, C.J., Hahn, K.T., Gunther, E.J., Pickup, S., Dugan, K.D., Innocent, N., Cardiff, R.D., Schnall, M.D., and Chodosh, L.A. (2002). Conditional activation of Neu in the mammary epithelium of transgenic mice results in reversible pulmonary metastasis. *Cancer Cell* *2*, 451–461.
- Moreland, J.L., Gramada, A., Buzko, O.V., Zhang, Q., and Bourne, P.E. (2005). The Molecular Biology Toolkit (MBT): a modular platform for developing molecular visualization applications. *BMC Bioinformatics* *6*, 21.
- Moressis, A., Friedrich, A.R., Pavlopoulos, E., Davis, R.L., and Skoulakis, E.M.C. (2009). A Dual Role for the Adaptor Protein DRK in Drosophila Olfactory Learning and Memory. *J. Neurosci.* *29*, 2611–2625.
- Morlacchi, P., Robertson, F.M., Klostergaard, J., and McMurray, J.S. (2014). Targeting SH2 domains in breast cancer. *Future Med. Chem.* *6*, 1909–1926.

- Morris, J.K., Lin, W., Hauser, C., Marchuk, Y., Getman, D., and Lee, K.-F. (1999). Rescue of the Cardiac Defect in ErbB2 Mutant Mice Reveals Essential Roles of ErbB2 in Peripheral Nervous System Development. *Neuron* *23*, 273–283.
- Mounsey, L.A., Deal, A.M., Keith, K.C., Benbow, J.M., Shachar, S.S., Zagar, T., Dees, E.C., Carey, L.A., Ewend, M.G., and Anders, C.K. (2017). Changing Natural History of HER2-Positive Breast Cancer Metastatic to the Brain in the Era of New Targeted Therapies. *Clin. Breast Cancer*.
- Mullen, P. (2004). The Use of Matrigel to Facilitate the Establishment of Human Cancer Cell Lines as Xenografts. In *Cancer Cell Culture*, (Humana Press), pp. 287–292.
- Muller, W.J., Sinn, E., Pattengale, P.K., Wallace, R., and Leder, P. (1988). Single-step induction of mammary adenocarcinoma in transgenic mice bearing the activated c-neu oncogene. *Cell* *54*, 105–115.
- Murphy, S.E., and Levine, T.P. (2016). VAP, a Versatile Access Point for the Endoplasmic Reticulum: Review and analysis of FFAT-like motifs in the VAPome. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Biol. Lipids* *1861*, 952–961.
- Musacchio, A., Saraste, M., and Wilmanns, M. (1994). High-resolution crystal structures of tyrosine kinase SH3 domains complexed with proline-rich peptides. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *1*, 546–551.
- Mustoe, T.A., Pierce, G.F., Thomason, A., Gramates, P., Sporn, M.B., and Deuel, T.F. (1987). Accelerated Healing of Incisional Wounds in Rats Induced by Transforming Growth Factor- β . *Science* *237*, 1333–1336.
- Muta, T., Kurosaki, T., Misulovin, Z., Sanchez, M., Nussenzweig, M.C., and Ravetch, J.V. (1994). A 13-amino-acid motif in the cytoplasmic domain of Fc γ RIIB modulates B-cell receptor signalling. *Nature* *368*, 70–73.
- Muthuswamy, S.K., Gilman, M., and Brugge, J.S. (1999). Controlled Dimerization of ErbB Receptors Provides Evidence for Differential Signaling by Homo- and Heterodimers. *Mol. Cell. Biol.* *19*, 6845–6857.
- Nagata, Y., Lan, K.-H., Zhou, X., Tan, M., Esteva, F.J., Sahin, A.A., Klos, K.S., Li, P., Monia, B.P., Nguyen, N.T., et al. (2004). PTEN activation contributes to tumor inhibition by trastuzumab, and loss of PTEN predicts trastuzumab resistance in patients. *Cancer Cell* *6*, 117–127.

- Nagy, P., Friedländer, E., Tanner, M., Kapanen, A.I., Carraway, K.L., Isola, J., and Jovin, T.M. (2005). Decreased Accessibility and Lack of Activation of ErbB2 in JIMT-1, a Herceptin-Resistant, MUC4-Expressing Breast Cancer Cell Line. *Cancer Res.* *65*, 473–482.
- Negro, A., Brar, B.K., and Lee, K.-F. (2004). Essential roles of Her2/erbB2 in cardiac development and function. *Recent Prog. Horm. Res.* *59*, 1–12.
- Nesvizhskii, A.I., Keller, A., Kolker, E., and Aebersold, R. (2003). A statistical model for identifying proteins by tandem mass spectrometry. *Anal. Chem.* *75*, 4646–4658.
- Neve, R.M., Chin, K., Fridlyand, J., Yeh, J., Baehner, F.L., Fevr, T., Clark, L., Bayani, N., Coppe, J.-P., Tong, F., et al. (2006). A collection of breast cancer cell lines for the study of functionally distinct cancer subtypes. *Cancer Cell* *10*, 515–527.
- Ngan, E., Northey, J.J., Brown, C.M., Ursini-Siegel, J., and Siegel, P.M. (2013). A complex containing LPP and -actinin mediates TGF β -induced migration and invasion of ErbB2-expressing breast cancer cells. *J. Cell Sci.* *126*, 1981–1991.
- Nishimura, Y., Hayashi, M., Inada, H., and Tanaka, T. (1999). Molecular Cloning and Characterization of Mammalian Homologues of Vesicle-Associated Membrane Protein-Associated (VAMP-Associated) Proteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *254*, 21–26.
- Nisticò, P., Modugno, F.D., Spada, S., and Bissell, M.J. (2014). β 1 and β 4 integrins: from breast development to clinical practice. *Breast Cancer Res. BCR* *16*.
- Nitta, H., Kelly, B.D., Allred, C., Jewell, S., Banks, P., Dennis, E., and Grogan, T.M. (2016). The assessment of HER2 status in breast cancer: the past, the present, and the future. *Pathol. Int.* *66*, 313–324.
- Nolen, B., Taylor, S., and Ghosh, G. (2004). Regulation of Protein Kinases: Controlling Activity through Activation Segment Conformation. *Mol. Cell* *15*, 661–675.
- Northey, J.J., Chmielecki, J., Ngan, E., Russo, C., Annis, M.G., Muller, W.J., and Siegel, P.M. (2008). Signaling through ShcA Is Required for Transforming Growth Factor β - and Neu/ErbB-2-Induced Breast Cancer Cell Motility and Invasion. *Mol. Cell. Biol.* *28*, 3162–3176.
- Northey, J.J., Dong, Z., Ngan, E., Kaplan, A., Hardy, W.R., Pawson, T., and Siegel, P.M. (2013). Distinct Phosphotyrosine-dependent Functions of the ShcA Adaptor Protein Are Required for Transforming Growth Factor β (TGF β)-induced Breast Cancer Cell Migration, Invasion, and Metastasis. *J. Biol. Chem.* *288*, 5210–5222.

- Ogiso, H., Ishitani, R., Nureki, O., Fukai, S., Yamanaka, M., Kim, J.-H., Saito, K., Sakamoto, A., Inoue, M., Shirouzu, M., et al. (2002). Crystal Structure of the Complex of Human Epidermal Growth Factor and Receptor Extracellular Domains. *Cell* *110*, 775–787.
- Oh, A.S., Lorant, L.A., Holloway, J.N., Miller, D.L., Kern, F.G., and El-Ashry, D. (2001). Hyperactivation of MAPK Induces Loss of ER α Expression in Breast Cancer Cells. *Mol. Endocrinol.* *15*, 1344–1359.
- Olivier, J.P., Raabe, T., Henkemeyer, M., Dickson, B., Mbamalu, G., Margolis, B., Schlessinger, J., Hafen, E., and Pawson, T. (1993). A Drosophila SH2-SH3 adaptor protein implicated in coupling the sevenless tyrosine kinase to an activator of Ras guanine nucleotide exchange, Sos. *Cell* *73*, 179–191.
- Olumi, A.F., Grossfeld, G.D., Hayward, S.W., Carroll, P.R., Tlsty, T.D., and Cunha, G.R. (1999). Carcinoma-associated fibroblasts direct tumor progression of initiated human prostatic epithelium. *Cancer Res.* *59*, 5002–5011.
- Ostrander, J.H., Daniel, A.R., Lofgren, K., Kleer, C.G., and Lange, C.A. (2007). Breast Tumor Kinase (Protein Tyrosine Kinase 6) Regulates Heregulin-Induced Activation of ERK5 and p38 MAP Kinases in Breast Cancer Cells. *Cancer Res.* *67*, 4199–4209.
- Otten, A.D., Sanders, M.M., and McKnight, G.S. (1988). The MMTV LTR promoter is induced by progesterone and dihydrotestosterone but not by estrogen. *Mol. Endocrinol.* *Baltim. Md* *2*, 143–147.
- Ottinger, E.A., Botfield, M.C., and Shoelson, S.E. (1998). Tandem SH2 domains confer high specificity in tyrosine kinase signaling. *J. Biol. Chem.* *273*, 729–735.
- Paardekooper Overman, J., Yi, J.-S., Bonetti, M., Soulsby, M., Preisinger, C., Stokes, M.P., Hui, L., Silva, J.C., Overvoorde, J., Giansanti, P., et al. (2014). PZR Coordinates Shp2 Noonan and LEOPARD Syndrome Signaling in Zebrafish and Mice. *Mol. Cell. Biol.* *34*, 2874–2889.
- Pályi-Krekk, Z., Barok, M., Isola, J., Tammi, M., Szöllo'si, J., and Nagy, P. (2007). Hyaluronan-induced masking of ErbB2 and CD44-enhanced trastuzumab internalisation in trastuzumab resistant breast cancer. *Eur. J. Cancer* *43*, 2423–2433.
- Park, M.-J., Sheng, R., Silkov, A., Jung, D.-J., Wang, Z.-G., Xin, Y., Kim, H., Thiagarajan-Rosenkranz, P., Song, S., Yoon, Y., et al. (2016). SH2 Domains Serve as Lipid-Binding Modules for pTyr-Signaling Proteins. *Mol. Cell* *62*, 7–20.

- Park, T.-J., Boyd, K., and Curran, T. (2006). Cardiovascular and Craniofacial Defects in Crk-Null Mice. *Mol. Cell. Biol.* *26*, 6272–6282.
- Pascal, S.M., Singer, A.U., Gish, G., Yamazaki, T., Shoelson, S.E., Pawson, T., Kay, L.E., and Forman-Kay, J.D. (1994). Nuclear magnetic resonance structure of an SH2 domain of phospholipase C- γ 1 complexed with a high affinity binding peptide. *Cell* *77*, 461–472.
- Pawson, T. (2004). Specificity in Signal Transduction: From Phosphotyrosine-SH2 Domain Interactions to Complex Cellular Systems. *Cell* *116*, 191–203.
- Pawson, T. (2007). Dynamic control of signaling by modular adaptor proteins. *Curr. Opin. Cell Biol.* *19*, 112–116.
- Pawson, T., and Gish, G.D. (1992). SH2 and SH3 domains: from structure to function. *Cell* *71*, 359–362.
- Pawson, T., and Nash, P. (2003). Assembly of cell regulatory systems through protein interaction domains. *Science* *300*, 445–452.
- Pawson, T., and Scott, J.D. (1997). Signaling Through Scaffold, Anchoring, and Adaptor Proteins. *Science* *278*, 2075–2080.
- Pawson, T., and Warner, N. (2007). Oncogenic re-wiring of cellular signaling pathways. *Oncogene* *26*, 1268–1275.
- Pawson, T., Gish, G.D., and Nash, P. (2001). SH2 domains, interaction modules and cellular wiring. *Trends Cell Biol.* *11*, 504–511.
- Pedersen, K., Angelini, P.-D., Laos, S., Bach-Faig, A., Cunningham, M.P., Ferrer-Ramón, C., Luque-García, A., García-Castillo, J., Parra-Palau, J.L., Scaltriti, M., et al. (2009). A Naturally Occurring HER2 Carboxy-Terminal Fragment Promotes Mammary Tumor Growth and Metastasis. *Mol. Cell. Biol.* *29*, 3319–3331.
- Pegram, M., Hsu, S., Lewis, G., Pietras, R., Beryt, M., Sliwkowski, M., Coombs, D., Baly, D., Kabbinavar, F., and Slamon, D. (1999). Inhibitory effects of combinations of HER-2/neu antibody and chemotherapeutic agents used for treatment of human breast cancers. *Oncogene* *18*, 2241–2251.
- Peles, E., Lamprecht, R., Ben-Levy, R., Tzahar, E., and Yarden, Y. (1992). Regulated coupling of the Neu receptor to phosphatidylinositol 3'-kinase and its release by oncogenic activation. *J. Biol. Chem.* *267*, 12266–12274.

- Penengo, L., Rubin, C., Yarden, Y., and Gaudino, G. (2003). c-Cbl is a critical modulator of the Ron tyrosine kinase receptor. *Oncogene* *22*, 3669–3679.
- Perou, C.M., Sørlie, T., Eisen, M.B., van de Rijn, M., Jeffrey, S.S., Rees, C.A., Pollack, J.R., Ross, D.T., Johnsen, H., Akslen, L.A., et al. (2000). Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* *406*, 747–752.
- Perrimon, N., and Perkins, L.A. (1997). There Must Be 50 Ways to Rule the Signal: The Case of the Drosophila EGF Receptor. *Cell* *89*, 13–16.
- Perrimon, N., Lu, X., Hou, X.S., Hsu, J.C., Melnick, M.B., Chou, T.B., and Perkins, L.A. (1995). Dissection of the Torso signal transduction pathway in Drosophila. *Mol. Reprod. Dev.* *42*, 515–522.
- Petersen, O.W., Rønnow-Jessen, L., Howlett, A.R., and Bissell, M.J. (1992). Interaction with basement membrane serves to rapidly distinguish growth and differentiation pattern of normal and malignant human breast epithelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *89*, 9064.
- Petschnigg, J., Groisman, B., Kotlyar, M., Taipale, M., Zheng, Y., Kurat, C.F., Sayad, A., Sierra, J.R., Usaj, M.M., Snider, J., et al. (2014). The mammalian-membrane two-hybrid assay (MaMTH) for probing membrane-protein interactions in human cells. *Nat. Methods* *11*, 585–592.
- Pickup, M., Novitskiy, S., and Moses, H.L. (2013). The roles of TGF β in the tumour microenvironment. *Nat. Rev. Cancer* *13*, 788–799.
- Picotti, P., Bodenmiller, B., Mueller, L.N., Domon, B., and Aebersold, R. (2009). Full Dynamic Range Proteome Analysis of *S. cerevisiae* by Targeted Proteomics. *Cell* *138*, 795–806.
- Piechocki, M.P., Ho, Y.-S., Pilon, S., and Wei, W.-Z. (2003). Human ErbB-2 (Her-2) Transgenic Mice: A Model System for Testing Her-2 Based Vaccines. *J. Immunol.* *171*, 5787–5794.
- Pietras, R.J., Fendly, B.M., Chazin, V.R., Pegram, M.D., Howell, S.B., and Slamon, D.J. (1994). Antibody to HER-2/neu receptor blocks DNA repair after cisplatin in human breast and ovarian cancer cells. *Oncogene* *9*, 1829–1838.
- Pietras, R.J., Pegram, M.D., Finn, R.S., Maneval, D.A., and Slamon, D.J. (1998). Remission of human breast cancer xenografts on therapy with humanized monoclonal antibody to HER-2 receptor and DNA-reactive drugs. *Oncogene* *17*, 2235–2249.

- Pinilla-Macua, I., Watkins, S.C., and Sorkin, A. (2016). Endocytosis separates EGF receptors from endogenous fluorescently labeled HRas and diminishes receptor signaling to MAP kinases in endosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *113*, 2122–2127.
- Pinkas-Kramarski, R., Soussan, L., Waterman, H., Levkowitz, G., Alroy, I., Klapper, L., Lavi, S., Seger, R., Ratzkin, B.J., Sela, M., et al. (1996). Diversification of Neu differentiation factor and epidermal growth factor signaling by combinatorial receptor interactions. *EMBO J.* *15*, 2452.
- Playford, M.P., and Schaller, M.D. (2004). The interplay between Src and integrins in normal and tumor biology. *Oncogene* *23*, 7928–7946.
- Plowman, G.D., Culouscou, J.M., Whitney, G.S., Green, J.M., Carlton, G.W., Foy, L., Neubauer, M.G., and Shoyab, M. (1993). Ligand-specific activation of HER4/p180erbB4, a fourth member of the epidermal growth factor receptor family. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *90*, 1746–1750.
- Polyak, K., and Metzger Filho, O. (2012). SnapShot: Breast Cancer. *Cancer Cell* *22*, 562–562.e1.
- Pongracz, J., Clark, P., Neoptolemos, J.P., and Lord, J.M. (1995). Expression of protein kinase C isoenzymes in colorectal cancer tissue and their differential activation by different bile acids. *Int. J. Cancer* *61*, 35–39.
- Ponzetto, C., Bardelli, A., Zhen, Z., Maina, F., dalla Zonca, P., Giordano, S., Graziani, A., Panayotou, G., and Comoglio, P.M. (1994). A multifunctional docking site mediates signaling and transformation by the hepatocyte growth factor/scatter factor receptor family. *Cell* *77*, 261–271.
- Prat, A., Pineda, E., Adamo, B., Galván, P., Fernández, A., Gaba, L., Díez, M., Viladot, M., Arance, A., and Muñoz, M. (2015). Clinical implications of the intrinsic molecular subtypes of breast cancer. *The Breast* *24*, *Supplement 2*, S26–S35.
- Price-Schiavi, S.A., Jepson, S., Li, P., Arango, M., Rudland, P.S., Yee, L., and Carraway, K.L. (2002). Rat Muc4 (sialomucin complex) reduces binding of anti-ErbB2 antibodies to tumor cell surfaces, a potential mechanism for herceptin resistance. *Int. J. Cancer* *99*, 783–791.

- Prigent, S.A., Lemoine, N.R., Hughes, C.M., Plowman, G.D., Selden, C., and Gullick, W.J. (1992). Expression of the c-erbB-3 protein in normal human adult and fetal tissues. *Oncogene* 7, 1273–1278.
- Puto, L.A. (2003). p21-activated Kinase 1 (PAK1) Interacts with the Grb2 Adapter Protein to Couple to Growth Factor Signaling. *J. Biol. Chem.* 278, 9388–9393.
- Qian, L., Chen, L., Shi, M., Yu, M., Jin, B., Hu, M., Xia, Q., Zhang, X., Shen, B., and Guo, N. (2006). A novel cis-acting element in Her2 promoter regulated by Stat3 in mammary cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 345, 660–668.
- Qiu, C., Tarrant, M.K., Choi, S.H., Sathyamurthy, A., Bose, R., Banjade, S., Pal, A., Bornmann, W.G., Lemmon, M.A., Cole, P.A., et al. (2008). Mechanism of Activation and Inhibition of the HER4/ErbB4 Kinase. *Structure* 16, 460–467.
- Rahuel, J., Gay, B., Erdmann, D., Strauss, A., García-Echeverría, C., Furet, P., Caravatti, G., Fretz, H., Schoepfer, J., and Grütter, M.G. (1996). Structural basis for specificity of GRB2-SH2 revealed by a novel ligand binding mode. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 3, 586–589.
- Rakha, E.A., and Green, A.R. (2017). Molecular classification of breast cancer: what the pathologist needs to know. *Pathology (Phila.)* 49, 111–119.
- Rao, M., Song, W., Jiang, A., Shyr, Y., Lev, S., Greenstein, D., Brantley-Sieders, D., and Chen, J. (2012). VAMP-Associated Protein B (VAPB) Promotes Breast Tumor Growth by Modulation of Akt Activity. *PLOS ONE* 7, e46281.
- Ratz, M., Testa, I., Hell, S.W., and Jakobs, S. (2015). CRISPR/Cas9-mediated endogenous protein tagging for RESOLFT super-resolution microscopy of living human cells. *Sci. Rep.* 5.
- Raven, J.F., Williams, V., Wang, S., Tremblay, M.L., Muller, W.J., Durbin, J.E., and Koromilas, A.E. (2011). Stat1 is a suppressor of ErbB2/Neu-mediated cellular transformation and mouse mammary gland tumor formation. *Cell Cycle* 10, 794–804.
- Red Brewer, M., Choi, S.H., Alvarado, D., Moravcevic, K., Pozzi, A., Lemmon, M.A., and Carpenter, G. (2009). The Juxtamembrane Region of the EGF Receptor Functions as an Activation Domain. *Mol. Cell* 34, 641–651.
- Ren, R., Mayer, B.J., Cicchetti, P., and Baltimore, D. (1993). Identification of a ten-amino acid proline-rich SH3 binding site. *Science* 259, 1157–1161.

- Rexer, B.N., Ham, A.-J.L., Rinehart, C., Hill, S., de Matos Granja-Ingram, N., González-Angulo, A.M., Mills, G.B., Dave, B., Chang, J.C., Liebler, D.C., et al. (2011). Phosphoproteomic mass spectrometry profiling links Src family kinases to escape from HER2 tyrosine kinase inhibition. *Oncogene* *30*, 4163–4174.
- Riethmacher, D., Sonnenberg-Riethmacher, E., Brinkmann, V., Yamaai, T., Lewin, G.R., and Birchmeier, C. (1997). Severe neuropathies in mice with targeted mutations in the ErbB3 receptor. *Nature* *389*, 725–730.
- Romeo, Y., Zhang, X., and Roux, P.P. (2012). Regulation and function of the RSK family of protein kinases. *Biochem. J.* *441*, 553–569.
- Roubelakis, M.G., Martin-Rendon, E., Tsaknakis, G., Stavropoulos, A., and Watt, S.M. (2007). The murine ortholog of the SHP-2 binding molecule, PZR accelerates cell migration on fibronectin and is expressed in early embryo formation. *J. Cell. Biochem.* *102*, 955–969.
- Roux, K.J., Kim, D.I., Raida, M., and Burke, B. (2012). A promiscuous biotin ligase fusion protein identifies proximal and interacting proteins in mammalian cells. *J. Cell Biol.* *196*, 801–810.
- Rozakis-Adcock, M., McGlade, J., Mbamalu, G., Pelicci, G., Daly, R., Li, W., Batzer, A., Thomas, S., Brugge, J., Pelicci, P.G., et al. (1992). Association of the Shc and Grb2/Sem5 SH2-containing proteins is implicated in activation of the Ras pathway by tyrosine kinases. *Nature* *360*, 689–692.
- Rozakis-Adcock, M., Fernley, R., Wade, J., Pawson, T., and Bowtell, D. (1993). The SH2 and SH3 domains of mammalian Grb2 couple the EGF receptor to the Ras activator mSos1. *Nature* *363*, 83–85.
- Saal, L.H., Holm, K., Maurer, M., Memeo, L., Su, T., Wang, X., Yu, J.S., Malmström, P.-O., Mansukhani, M., Enoksson, J., et al. (2005). PIK3CA Mutations Correlate with Hormone Receptors, Node Metastasis, and ERBB2, and Are Mutually Exclusive with PTEN Loss in Human Breast Carcinoma. *Cancer Res.* *65*, 2554–2559.
- Sabatier, R., Finetti, P., Guille, A., Adelaide, J., Chaffanet, M., Viens, P., Birnbaum, D., and Bertucci, F. (2014). Claudin-low breast cancers: clinical, pathological, molecular and prognostic characterization. *Mol. Cancer* *13*.

- Saxton, T.M., Cheng, A.M., Ong, S.H., Lu, Y., Sakai, R., Cross, J.C., and Pawson, T. (2001). Gene dosage-dependent functions for phosphotyrosine-Grb2 signaling during mammalian tissue morphogenesis. *Curr. Biol.* *11*, 662–670.
- Scaife, R., Gout, I., Waterfield, M.D., and Margolis, R.L. (1994). Growth factor-induced binding of dynamin to signal transduction proteins involves sorting to distinct and separate proline-rich dynamin sequences. *EMBO J.* *13*, 2574.
- Scaltriti, M., Rojo, F., Ocaña, A., Anido, J., Guzman, M., Cortes, J., Di Cosimo, S., Matias-Guiu, X., Ramon y Cajal, S., Arribas, J., et al. (2007). Expression of p95HER2, a Truncated Form of the HER2 Receptor, and Response to Anti-HER2 Therapies in Breast Cancer. *JNCI J. Natl. Cancer Inst.* *99*, 628–638.
- Schechter, A.L., Stern, D.F., Vaidyanathan, L., Decker, S.J., Drebin, J.A., Greene, M.I., and Weinberg, R.A. (1984). The neu oncogene: an erb-B-related gene encoding a 185,000-Mr tumour antigen. *Nature* *312*, 513–516.
- Schechter, A.L., Hung, M.C., Vaidyanathan, L., Weinberg, R.A., Yang-Feng, T.L., Francke, U., Ullrich, A., and Coussens, L. (1985). The neu gene: an erbB-homologous gene distinct from and unlinked to the gene encoding the EGF receptor. *Science* *229*, 976–978.
- Schiering, N., Casale, E., Caccia, P., Giordano, P., and Battistini, C. (2000). Dimer formation through domain swapping in the crystal structure of the Grb2-SH2-Ac-pYVNV complex. *Biochemistry (Mosc.)* *39*, 13376–13382.
- Schlaepfer, D.D., Hanks, S.K., Hunter, T., and van der Geer, P. (1994). Integrin-mediated signal transduction linked to Ras pathway by GRB2 binding to focal adhesion kinase. *Nature* *372*, 786–791.
- Schlaepfer, D.D., Broome, M.A., and Hunter, T. (1997). Fibronectin-stimulated signaling from a focal adhesion kinase-c-Src complex: involvement of the Grb2, p130cas, and Nck adaptor proteins. *Mol. Cell. Biol.* *17*, 1702–1713.
- Schlessinger, J. (2014). Receptor tyrosine kinases: legacy of the first two decades. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* *6*.
- Schlessinger, J., and Lemmon, M.A. (2003). SH2 and PTB Domains in Tyrosine Kinase Signaling. *Sci STKE* *2003*, re12-re12.
- Schneider, M.R., and Yarden, Y. (2016). The EGFR-HER2 module: a stem cell approach to understanding a prime target and driver of solid tumors. *Oncogene* *35*, 2949–2960.

- Schneider, T.D., and Stephens, R.M. (1990). Sequence logos: a new way to display consensus sequences. *Nucleic Acids Res.* *18*, 6097.
- Scholl, S., Beuzeboc, P., and Pouillart, P. (2001). Targeting HER2 in other tumor types. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.* *12 Suppl 1*, S81-87.
- Schroeder, J.A., and Lee, D.C. (1998). Dynamic expression and activation of ERBB receptors in the developing mouse mammary gland. *Cell Growth Differ.* *9*, 451.
- Schulze, W.X., Deng, L., and Mann, M. (2005). Phosphotyrosine interactome of the ErbB-receptor kinase family. *Mol. Syst. Biol.* *1*, 2005.0008.
- Sebastian, J., Richards, R.G., Walker, M.P., Wiesen, J.F., Werb, Z., Derynck, R., Hom, Y.K., Cunha, G.R., and DiAugustine, R.P. (1998). Activation and function of the epidermal growth factor receptor and erbB-2 during mammary gland morphogenesis. *Cell Growth Differ.* *9*, 777.
- Semba, K., Kamata, N., Toyoshima, K., and Yamamoto, T. (1985). A v-erbB-related protooncogene, c-erbB-2, is distinct from the c-erbB-1/epidermal growth factor-receptor gene and is amplified in a human salivary gland adenocarcinoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *82*, 6497–6501.
- Seton-Rogers, S.E., Lu, Y., Hines, L.M., Koundinya, M., LaBaer, J., Muthuswamy, S.K., and Brugge, J.S. (2004). Cooperation of the ErbB2 receptor and transforming growth factor β in induction of migration and invasion in mammary epithelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *101*, 1257–1262.
- Sever, S. (2002). Dynamin and endocytosis. *Curr. Opin. Cell Biol.* *14*, 463–467.
- Shaaban, A.M., Purdie, C.A., Bartlett, J.M.S., Stein, R.C., Lane, S., Francis, A., Thompson, A.M., and Pinder, S.E. (2014). HER2 testing for breast carcinoma: recommendations for rapid diagnostic pathways in clinical practice. *J. Clin. Pathol.* *67*, 161–167.
- She, H.Y., Rockow, S., Tang, J., Nishimura, R., Skolnik, E.Y., Chen, M., Margolis, B., and Li, W. (1997). Wiskott-Aldrich syndrome protein is associated with the adapter protein Grb2 and the epidermal growth factor receptor in living cells. *Mol. Biol. Cell* *8*, 1709–1721.
- Shewchuk, L.M., Hassell, A.M., Ellis, B., Holmes, W.D., Davis, R., Horne, E.L., Kadwell, S.H., McKee, D.D., and Moore, J.T. (2000). Structure of the Tie2 RTK Domain. *Structure* *8*, 1105–1113.

- Shiba-Ishii, A., Kim, Y., Shiozawa, T., Iyama, S., Satomi, K., Kano, J., Sakashita, S., Morishita, Y., and Noguchi, M. (2015). Stratifin accelerates progression of lung adenocarcinoma at an early stage. *Mol. Cancer* *14*, 142.
- Shih, C., Padhy, L.C., Murray, M., and Weinberg, R.A. (1981). Transforming genes of carcinomas and neuroblastomas introduced into mouse fibroblasts. *Nature* *290*, 261–264.
- Sibilia, M., Steinbach, J.P., Stingl, L., Aguzzi, A., and Wagner, E.F. (1998). A strain-independent postnatal neurodegeneration in mice lacking the EGF receptor. *EMBO J.* *17*, 719–731.
- Siegel, P.M., and Muller, W.J. (1996). Mutations affecting conserved cysteine residues within the extracellular domain of Neu promote receptor dimerization and activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *93*, 8878.
- Siegel, P.M., Dankort, D.L., Hardy, W.R., and Muller, W.J. (1994). Novel activating mutations in the neu proto-oncogene involved in induction of mammary tumors. *Mol. Cell. Biol.* *14*, 7068–7077.
- Siegel, P.M., Ryan, E.D., Cardiff, R.D., and Muller, W.J. (1999). Elevated expression of activated forms of Neu/ErbB-2 and ErbB-3 are involved in the induction of mammary tumors in transgenic mice: implications for human breast cancer. *EMBO J.* *18*, 2149–2164.
- Siegel, P.M., Shu, W., Cardiff, R.D., Muller, W.J., and Massague, J. (2003). Transforming growth factor signaling impairs Neu-induced mammary tumorigenesis while promoting pulmonary metastasis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *100*, 8430–8435.
- Silberstein, G.B., and Daniel, C.W. (1987). Reversible inhibition of mammary gland growth by transforming growth factor-beta. *Science* *237*, 291–293.
- Simon, M.A., Bowtell, D.D.L., Dodson, G.S., Laverty, T.R., and Rubin, G.M. (1991). Ras1 and a putative guanine nucleotide exchange factor perform crucial steps in signaling by the sevenless protein tyrosine kinase. *Cell* *67*, 701–716.
- Simon, M.A., Dodson, G.S., and Rubin, G.M. (1993). An SH3-SH2-SH3 protein is required for p21Ras1 activation and binds to sevenless and Sos proteins in vitro. *Cell* *73*, 169–177.
- Skolnik, E.Y., Margolis, B., Mohammadi, M., Lowenstein, E., Fischer, R., Drepps, A., Ullrich, A., and Schlessinger, J. (1991). Cloning of PI3 kinase-associated p85 utilizing a novel method for expression/cloning of target proteins for receptor tyrosine kinases. *Cell* *65*, 83–90.

- Skolnik, E.Y., Lee, C.H., Batzer, A., Vicentini, L.M., Zhou, M., Daly, R., Myers, M.J., Jr, Backer, J.M., Ullrich, A., et al. (1993). The SH2/SH3 domain-containing protein GRB2 interacts with tyrosine-phosphorylated IRS1 and Shc: implications for insulin control of ras signalling. *EMBO J.* *12*, 1929.
- Slamon, D.J., Clark, G.M., Wong, S.G., Levin, W.J., Ullrich, A., and McGuire, W.L. (1987). Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science* *235*, 177–182.
- Société Canadienne du cancer
- Soltoff, S.P., Carraway, K.L., Prigent, S.A., Gullick, W.G., and Cantley, L.C. (1994). ErbB3 is involved in activation of phosphatidylinositol 3-kinase by epidermal growth factor. *Mol. Cell. Biol.* *14*, 3550–3558.
- Songyang, Z., and Cantley, L.C. (1995). Recognition and specificity in protein tyrosine kinase-mediated signalling. *Trends Biochem. Sci.* *20*, 470–475.
- Songyang, Z., Shoelson, S.E., Chaudhuri, M., Gish, G., Pawson, T., Haser, W.G., King, F., Roberts, T., Ratnofsky, S., Lechleider, R.J., et al. (1993). SH2 domains recognize specific phosphopeptide sequences. *Cell* *72*, 767–778.
- Songyang, Z., Shoelson, S.E., McGlade, J., Olivier, P., Pawson, T., Bustelo, X.R., Barbacid, M., Sabe, H., Hanafusa, H., and Yi, T. (1994). Specific motifs recognized by the SH2 domains of Csk, 3BP2, fps/fes, GRB-2, HCP, SHC, Syk, and Vav. *Mol. Cell. Biol.* *14*, 2777–2785.
- Soriano, J.V., Liu, N., Gao, Y., Yao, Z.-J., Ishibashi, T., Underhill, C., Burke, T.R., and Bottaro, D.P. (2004). Inhibition of angiogenesis by growth factor receptor bound protein 2-Src homology 2 domain bound antagonists. *Mol. Cancer Ther.* *3*, 1289–1299.
- Sorkin, A., and Goh, L.K. (2009). Endocytosis and intracellular trafficking of ErbBs. *Exp. Cell Res.* *315*, 683–696.
- Sorkin, A., Di Fiore, P.P., and Carpenter, G. (1993). The carboxyl terminus of epidermal growth factor receptor/erbB-2 chimerae is internalization impaired. *Oncogene* *8*, 3021–3028.
- Sørlie, T., Perou, C.M., Tibshirani, R., Aas, T., Geisler, S., Johnsen, H., Hastie, T., Eisen, M.B., Rijn, M. van de, Jeffrey, S.S., et al. (2001). Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *98*, 10869–10874.

- Sorlie, T., Tibshirani, R., Parker, J., Hastie, T., Marron, J.S., Nobel, A., Deng, S., Johnsen, H., Pesich, R., Geisler, S., et al. (2003). Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *100*, 8418–8423.
- Sotiriou, C., and Piccart, M.J. (2007). Taking gene-expression profiling to the clinic: when will molecular signatures become relevant to patient care? *Nat. Rev. Cancer* *7*, 545–553.
- Sparks, A.B., Rider, J.E., Hoffman, N.G., Fowlkes, D.M., Quillam, L.A., and Kay, B.K. (1996). Distinct ligand preferences of Src homology 3 domains from Src, Yes, Abl, Cortactin, p53bp2, PLCgamma, Crk, and Grb2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *93*, 1540–1544.
- Stautz, D., Leyme, A., Grandal, M.V., Albrechtsen, R., van Deurs, B., Wewer, U., and Kveiborg, M. (2012). Cell-surface Metalloprotease ADAM12 is Internalized by a Clathrin-and Grb2-dependent Mechanism. *Traffic* *13*, 1532–1546.
- Stephens, P., Hunter, C., Bignell, G., Edkins, S., Davies, H., Teague, J., Stevens, C., O'Meara, S., Smith, R., Parker, A., et al. (2004). Lung cancer: Intragenic ERBB2 kinase mutations in tumours. *Nature* *431*, 525–526.
- Stern, D.F. (2008). ERBB3/HER3 and ERBB2/HER2 Duet in Mammary Development and Breast Cancer. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* *13*, 215.
- Stern, M.J., Marengere, L.E., Daly, R.J., Lowenstein, E.J., Kokel, M., Batzer, A., Olivier, P., Pawson, T., and Schlessinger, J. (1993). The human GRB2 and *Drosophila* Drk genes can functionally replace the *Caenorhabditis elegans* cell signaling gene sem-5. *Mol. Biol. Cell* *4*, 1175–1188.
- St-Laurent, V., Sanchez, M., Charbonneau, C., and Tremblay, A. (2005). Selective hormone-dependent repression of estrogen receptor beta by a p38-activated ErbB2/ErbB3 pathway. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* *94*, 23–37.
- Sun, J., Pedersen, M., Bengtsson, S., and Rönnstrand, L. (2007). Grb2 mediates negative regulation of stem cell factor receptor/c-Kit signaling by recruitment of Cbl. *Exp. Cell Res.* *313*, 3935–3942.
- Takahashi, Y., Akanuma, Y., Yazaki, Y., and Kadokawa, T. (1999). Formation of distinct signalling complexes involving phosphatidylinositol 3-kinase activity with stimulation of epidermal growth factor or insulin-like growth factor-I in human skin fibroblasts. *J. Cell. Physiol.* *178*, 69–75.

- Tanaka, K., Shirotsuki, S., Iwata, T., Kageyama, C., Tahara, T., Nozaki, S., Siwu, E.R.O., Tamura, S., Douke, S., Murakami, N., et al. (2012). Template-Assisted and Self-Activating Clicked Peptide as a Synthetic Mimic of the SH2 Domain. *ACS Chem. Biol.* *7*, 637–645.
- Tanaka, M., Gupta, R., and Mayer, B.J. (1995). Differential inhibition of signaling pathways by dominant-negative SH2/SH3 adapter proteins. *Mol. Cell. Biol.* *15*, 6829–6837.
- Tashiro, K., Tsunematsu, T., Okubo, H., Ohta, T., Sano, E., Yamauchi, E., Taniguchi, H., and Konishi, H. (2009). GAREM, a Novel Adaptor Protein for Growth Factor Receptor-bound Protein 2, Contributes to Cellular Transformation through the Activation of Extracellular Signal-regulated Kinase Signaling. *J. Biol. Chem.* *284*, 20206.
- Temin, H.M. (1966). Studies on Carcinogenesis by Avian Sarcoma Viruses. III. The Differential Effect of Serum and Polyanions on Multiplication of Uninfected and Converted Cells. *JNCI J. Natl. Cancer Inst.* *37*, 167–175.
- Temin, H.M. (1967). Studies on carcinogenesis by avian sarcoma viruses. VI. Differential multiplication of uninfected and of converted cells in response to insulin. *J. Cell. Physiol.* *69*, 377–384.
- Terasawa, H., Kohda, D., Hatanaka, H., Tsuchiya, S., Ogura, K., Nagata, K., Ishii, S., Mandiyan, V., Ullrich, A., Schlessinger, J., et al. (1994). Structure of the N-terminal SH3 domain of GRB2 complexed with a peptide from the guanine nucleotide releasing factor Sos. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *1*, 891–897.
- Thornton, K.H., Mueller, W.T., McConnell, P., Zhu, G., Saltiel, A.R., and Thanabal, V. (1996). Nuclear magnetic resonance solution structure of the growth factor receptor-bound protein 2 Src homology 2 domain. *Biochemistry (Mosc.)* *35*, 11852–11864.
- Tidcombe, H., Jackson-Fisher, A., Mathers, K., Stern, D.F., Gassmann, M., and Golding, J.P. (2003). Neural and mammary gland defects in ErbB4 knockout mice genetically rescued from embryonic lethality. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *100*, 8281–8286.
- Totta, P., Busonero, C., Leone, S., Marino, M., and Accocia, F. (2016). Dynamin II is required for 17 β -estradiol signaling and autophagy-based ER α degradation. *Sci. Rep.* *6*.
- Tsé, C., Gauchez, A.-S., Jacot, W., and Lamy, P.-J. (2012). HER2 shedding and serum HER2 extracellular domain: Biology and clinical utility in breast cancer. *Cancer Treat. Rev.* *38*, 133–142.

- Tzahar, E., Waterman, H., Chen, X., Levkowitz, G., Karunagaran, D., Lavi, S., Ratzkin, B.J., and Yarden, Y. (1996). A hierarchical network of interreceptor interactions determines signal transduction by Neu differentiation factor/neuregulin and epidermal growth factor. *Mol. Cell. Biol.* *16*, 5276–5287.
- Uhlén, M., Fagerberg, L., Hallström, B.M., Lindskog, C., Oksvold, P., Mardinoglu, A., Sivertsson, Å., Kampf, C., Sjöstedt, E., Asplund, A., et al. (2015). Proteomics. Tissue-based map of the human proteome. *Science* *347*, 1260419.
- Ursini-Siegel, J., Schade, B., Cardiff, R.D., and Muller, W.J. (2007). Insights from transgenic mouse models of ERBB2-induced breast cancer. *Nat. Rev. Cancer* *7*, 389–397.
- Varga, A., Czifra, G., Tállai, B., Németh, T., Kovács, I., Kovács, L., and Bíró, T. (2004). Tumor Grade-Dependent Alterations in the Protein Kinase C Isoform Pattern in Urinary Bladder Carcinomas. *Eur. Urol.* *46*, 462–465.
- Vargo-Gogola, T., and Rosen, J.M. (2007). Modelling breast cancer: one size does not fit all. *Nat. Rev. Cancer* *7*, 659–672.
- Vennin, C., Spruyt, N., Dahmani, F., Julien, S., Bertucci, F., Finetti, P., Chassat, T., Bourette, R.P., Bourhis, X.L., Adriaenssens, E., et al. (2015). H19 non coding RNA-derived miR-675 enhances tumorigenesis and metastasis of breast cancer cells by downregulating c-Cbl and Cbl-b. *Oncotarget* *6*, 29209–29223.
- Verbeek, B.S., Adriaansen-slot, S.S., Rijken, G., and Vroom, T.M. (1997). Grb2 overexpression in nuclei and cytoplasm of human breast cells: a histochemical and biochemical study of normal and neoplastic mammary tissue specimens. *J. Pathol.* *183*, 195–203.
- Verma, S., Miles, D., Gianni, L., Krop, I.E., Welslau, M., Baselga, J., Pegram, M., Oh, D.-Y., Diéras, V., Guardino, E., et al. (2012). Trastuzumab emtansine for HER2-positive advanced breast cancer. *N. Engl. J. Med.* *367*, 1783–1791.
- Vernimmen, D., Gueders, M., Pisvin, S., Delvenne, P., and Winkler, R. (2003a). Different mechanisms are implicated in ERBB2 gene overexpression in breast and in other cancers. *Br. J. Cancer* *89*, 899–906.
- Vernimmen, D., Begon, D., Salvador, C., Gofflot, S., Grooteclaes, M., and Winkler, R. (2003b). Identification of HTF (HER2 transcription factor) as an AP-2 (activator protein-2)

- transcription factor and contribution of the HTF binding site to ERBB2 gene overexpression. *Biochem. J.* 370, 323–329.
- Wagner, K.-U., Krempler, A., Triplett, A.A., Qi, Y., George, N.M., Zhu, J., and Rui, H. (2004). Impaired Alveogenesis and Maintenance of Secretory Mammary Epithelial Cells in Jak2 Conditional Knockout Mice. *Mol. Cell. Biol.* 24, 5510–5520.
- Waksman, G., Kominos, D., Robertson, S.C., Pant, N., Baltimore, D., Birge, R.B., Cowburn, D., Hanafusa, H., Mayer, B.J., Overduin, M., et al. (1992). Crystal structure of the phosphotyrosine recognition domain SH2 of v-src complexed with tyrosine-phosphorylated peptides. *Nature* 358, 646–653.
- Waksman, G., Shoelson, S.E., Pant, N., Cowburn, D., and Kuriyan, J. (1993). Binding of a high affinity phosphotyrosyl peptide to the Src SH2 domain: Crystal structures of the complexed and peptide-free forms. *Cell* 72, 779–790.
- Wang, Z., and Moran, M.F. (1996). Requirement for the Adapter Protein GRB2 in EGF Receptor Endocytosis. *Science* 272, 1935–1938.
- Wang, F., Hansen, R.K., Radisky, D., Yoneda, T., Barcellos-Hoff, M.H., Petersen, O.W., Turley, E.A., and Bissell, M.J. (2002). Phenotypic Reversion or Death of Cancer Cells by Altering Signaling Pathways in Three-Dimensional Contexts. *J. Natl. Cancer Inst.* 94, 1494.
- Wang, J., Auger, K.R., Jarvis, L., Shi, Y., and Roberts, T.M. (1995). Direct Association of Grb2 with the p85 Subunit of Phosphatidylinositol 3-Kinase. *J. Biol. Chem.* 270, 12774–12780.
- Wang, S.-C., Lien, H.-C., Xia, W., Chen, I.-F., Lo, H.-W., Wang, Z., Ali-Seyed, M., Lee, D.-F., Bartholomeusz, G., Ou-Yang, F., et al. (2004a). Binding at and transactivation of the COX-2 promoter by nuclear tyrosine kinase receptor ErbB-2. *Cancer Cell* 6, 251–261.
- Wang, S.E., Shin, I., Wu, F.Y., Friedman, D.B., and Arteaga, C.L. (2006). HER2/Neu (ErbB2) Signaling to Rac1-Pak1 Is Temporally and Spatially Modulated by Transforming Growth Factor β . *Cancer Res.* 66, 9591–9600.
- Wang, S.E., Xiang, B., Zent, R., Quaranta, V., Pozzi, A., and Arteaga, C.L. (2009). Transforming Growth Factor β Induces Clustering of HER2 and Integrins by Activating Src-Focal Adhesion Kinase and Receptor Association to the Cytoskeleton. *Cancer Res.* 69, 475–482.

- Wang, Y., Pennock, S.D., Chen, X., Kazlauskas, A., and Wang, Z. (2004b). Platelet-derived Growth Factor Receptor-mediated Signal Transduction from Endosomes. *J. Biol. Chem.* *279*, 8038–8046.
- Wang, Y.-Y., Lehuédé, C., Laurent, V., Dirat, B., Dauvillier, S., Bochet, L., Le Gonidec, S., Escourrou, G., Valet, P., and Muller, C. (2012). Adipose tissue and breast epithelial cells: a dangerous dynamic duo in breast cancer. *Cancer Lett.* *324*, 142–151.
- Ward, T.M., Iorns, E., Liu, X., Hoe, N., Kim, P., Singh, S., Dean, S., Jegg, A.-M., Gallas, M., Rodriguez, C., et al. (2013). Truncated p110 ERBB2 induces mammary epithelial cell migration, invasion and orthotopic xenograft formation, and is associated with loss of phosphorylated STAT5. *Oncogene* *32*, 2463–2474.
- Watanabe, K., Fukuchi, T., Hosoya, H., Shirasawa, T., Matuoka, K., Miki, H., and Takenawa, T. (1995). Splicing Isoforms of Rat Ash/Grb2. ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF THE cDNA AND GENOMIC DNA CLONES AND IMPLICATIONS FOR THE PHYSIOLOGICAL ROLES OF THE ISOFORMS. *J. Biol. Chem.* *270*, 13733–13739.
- Watanabe, T., Ono, Y., Taniyama, Y., Hazama, K., Igarashi, K., Ogita, K., Kikkawa, U., and Nishizuka, Y. (1992). Cell division arrest induced by phorbol ester in CHO cells overexpressing protein kinase C-delta subspecies. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *89*, 10159.
- Weber-Boyyat, M., Kentala, H., Lilja, J., Vihervaara, T., Hanninen, R., Zhou, Y., Peränen, J., Nyman, T.A., Ivaska, J., and Olkkonen, V.M. (2015). OSBP-related protein 3 (ORP3) coupling with VAMP-associated protein A regulates R-Ras activity. *Exp. Cell Res.* *331*, 278–291.
- Weigelt, B., Warne, P.H., and Downward, J. (2011). PIK3CA mutation, but not PTEN loss of function, determines the sensitivity of breast cancer cells to mTOR inhibitory drugs. *Oncogene* *30*, 3222–3233.
- Weisswange, I., Newsome, T.P., Schleich, S., and Way, M. (2009). The rate of N-WASP exchange limits the extent of ARP2/3-complex-dependent actin-based motility. *Nature* *458*, 87–91.
- Wirtz, D., Konstantopoulos, K., and Searson, P.C. (2011). The physics of cancer: the role of physical interactions and mechanical forces in metastasis. *Nat. Rev. Cancer* *11*, 512–522.
- Woldeyesus, M.T., Britsch, S., Riethmacher, D., Xu, L., Sonnenberg-Riethmacher, E., Abou-Rebyeh, F., Harvey, R., Caroni, P., and Birchmeier, C. (1999). Peripheral nervous system

- defects in erbB2 mutants following genetic rescue of heart development. *Genes Dev.* *13*, 2538–2548.
- Worthington, J., Bertani, M., Chan, H.-L., Gerrits, B., and Timms, J.F. (2010). Transcriptional profiling of ErbB signalling in mammary luminal epithelial cells - interplay of ErbB and IGF1 signalling through IGFBP3 regulation. *BMC Cancer* *10*, 490.
- Wu, X., Knudsen, B., Feller, S.M., Zheng, J., Sali, A., Cowburn, D., Hanafusa, H., and Kuriyan, J. (1995). Structural basis for the specific interaction of lysine-containing proline-rich peptides with the N-terminal SH3 domain of c-Crk. *Struct. Lond. Engl.* *1993* *3*, 215–226.
- Wybenga-Groot, L.E., Baskin, B., Ong, S.H., Tong, J., Pawson, T., and Sicheri, F. (2001). Structural Basis for Autoinhibition of the EphB2 Receptor Tyrosine Kinase by the Unphosphorylated Juxtamembrane Region. *Cell* *106*, 745–757.
- Xie, Y., Pendergast, A.M., and Hung, M.-C. (1995). Dominant-negative Mutants of Grb2 Induced Reversal of the Transformed Phenotypes Caused by the Point Mutation-activated Rat HER-2/Neu. *J. Biol. Chem.* *270*, 30717–30724.
- Xiong, S., Grijalva, R., Zhang, L., Nguyen, N.T., Pisters, P.W., Pollock, R.E., and Yu, D. (2001). Up-Regulation of Vascular Endothelial Growth Factor in Breast Cancer Cells by the Heregulin- β 1-activated p38 Signaling Pathway Enhances Endothelial Cell Migration. *Cancer Res.* *61*, 1727–1732.
- Xu, B., Bird, V.G., and Miller, W.T. (1995). Substrate Specificities of the Insulin and Insulin-like Growth Factor 1 Receptor Tyrosine Kinase Catalytic Domains. *J. Biol. Chem.* *270*, 29825–29830.
- Yakes, F.M., Chinratanalab, W., Ritter, C.A., King, W., Seelig, S., and Arteaga, C.L. (2002). Herceptin-induced Inhibition of Phosphatidylinositol-3 Kinase and Akt Is Required for Antibody-mediated Effects on p27, Cyclin D1, and Antitumor Action. *Cancer Res.* *62*, 4132–4141.
- Yamada, H., Takeda, T., Michiue, H., Abe, T., and Takei, K. (2016). Actin bundling by dynamin 2 and cortactin is implicated in cell migration by stabilizing filopodia in human non-small cell lung carcinoma cells. *Int. J. Oncol.* *49*, 877–886.

- Yamamoto, T., Hihara, H., Nishida, T., Kawai, S., and Toyoshima, K. (1983a). A new avian erythroblastosis virus, AEV-H, carries erbB gene responsible for the induction of both erythroblastosis and sarcomas. *Cell* *34*, 225–232.
- Yamamoto, T., Nishida, T., Miyajima, N., Kawai, S., Ooi, T., and Toyoshima, K. (1983b). The erbB gene of avian erythroblastosis virus is a member of the src gene family. *Cell* *35*, 71–78.
- Yen, L., You, X.L., Al Moustafa, A.E., Batist, G., Hynes, N.E., Mader, S., Meloche, S., and Alaoui-Jamali, M.A. (2000). Heregulin selectively upregulates vascular endothelial growth factor secretion in cancer cells and stimulates angiogenesis. *Oncogene* *19*, 3460–3469.
- Yen, L., Benlimame, N., Nie, Z.-R., Xiao, D., Wang, T., Moustafa, A.-E.A., Esumi, H., Milanini, J., Hynes, N.E., Pages, G., et al. (2002). Differential Regulation of Tumor Angiogenesis by Distinct ErbB Homo- and Heterodimers. *Mol. Biol. Cell* *13*, 4029–4044.
- Yu, G.Z., Chen, Y., and Wang, J.J. (2009). Overexpression of Grb2/HER2 signaling in Chinese gastric cancer: their relationship with clinicopathological parameters and prognostic significance. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* *135*, 1331–1339.
- Yu, H., Chen, J.K., Feng, S., Dalgarno, D.C., Brauer, A.W., and Schrelber, S.L. (1994). Structural basis for the binding of proline-rich peptides to SH3 domains. *Cell* *76*, 933–945.
- Zannettino, A.C.W., Roubelakis, M., Welldon, K.J., Jackson, D.E., Simmons, P.J., Bendall, L.J., Henniker, A., Harrison, K.L., Niutta, S., Bradstock, K.F., et al. (2003). Novel mesenchymal and haematopoietic cell isoforms of the SHP-2 docking receptor, PZR: identification, molecular cloning and effects on cell migration. *Biochem. J.* *370*, 537–549.
- Zhang, L., Teng, Y., Fan, Y., Wang, Y., Li, W., Shi, J., Ma, Y., Li, C., Shi, X., Qu, X., et al. (2015). The E3 ubiquitin ligase Cbl-b improves the prognosis of RANK positive breast cancer patients by inhibiting RANKL-induced cell migration and metastasis. *Oncotarget* *6*, 22918–22933.
- Zhang, X., Gureasko, J., Shen, K., Cole, P.A., and Kuriyan, J. (2006). An Allosteric Mechanism for Activation of the Kinase Domain of Epidermal Growth Factor Receptor. *Cell* *125*, 1137–1149.
- Zhao, R., and Zhao, Z.J. (2000). Dissecting the Interaction of SHP-2 with PZR, an Immunoglobulin Family Protein Containing Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibitory Motifs. *J. Biol. Chem.* *275*, 5453–5459.

- Zhao, R., and Zhao, Z.J. (2003). Identification of a variant form of PZR lacking immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motifs. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 303, 1028–1033.
- Zhao, Z.J., and Zhao, R. (1998). Purification and cloning of PZR, a binding protein and putative physiological substrate of tyrosine phosphatase SHP-2. *J. Biol. Chem.* 273, 29367–29372.
- Zhao, R., Guerrah, A., Tang, H., and Zhao, Z.J. (2002). Cell surface glycoprotein PZR is a major mediator of concanavalin A-induced cell signaling. *J. Biol. Chem.* 277, 7882–7888.
- Zhao, R., Fu, X., Teng, L., Li, Q., and Zhao, Z.J. (2003). Blocking the function of tyrosine phosphatase SHP-2 by targeting its Src homology 2 domains. *J. Biol. Chem.* 278, 42893–42898.
- Zhao, T., Miao, Z., Wang, Z., Xu, Y., Wu, J., Liu, X., You, Y., and Li, J. (2013). Overexpression of CRKL correlates with malignant cell proliferation in breast cancer. *Tumor Biol.* 34, 2891–2897.
- Zhao, Z., Tan, Z., Wright, J.H., Diltz, C.D., Shen, S.-H., Krebs, E.G., and Fischer, E.H. (1995). Altered Expression of Protein-tyrosine Phosphatase 2C in 293 Cells Affects Protein Tyrosine Phosphorylation and Mitogen-activated Protein Kinase Activation. *J. Biol. Chem.* 270, 11765–11769.
- Zhou, X., and Agazie, Y.M. (2009). Molecular Mechanism for SHP2 in Promoting HER2-induced Signaling and Transformation. *J. Biol. Chem.* 284, 12226–12234.

ADDIN ZOTERO_BIBL {"custom":[] } CSL_BIBLIOGRAPHY

Annexe : Sample Preparation for Mass Spectrometry Analysis of Protein-Protein Interactions in Cancer Cell Lines and Tissues

Alice Beigbeder^{1,2*}, Lauriane Vélot^{1,2*}, D. Andrew James⁵ and Nicolas Bisson^{1,2,3,4#}

¹Centre de recherche du CHU de Québec, Division of Oncology, Québec, QC, Canada.

²Cancer Research Centre, ³Quebec Network for Research on Protein Function, Engineering, and Applications (PROTEO), ⁴Department of Molecular Biology, Medical Biochemistry and Pathology, Université Laval, Québec, QC, Canada and ⁵Sanofi-Pasteur, Toronto, ON, Canada.

#To whom correspondence should be addressed (nick.bisson@crchudequebec.ulaval.ca)

*Alice Beigbeder and Lauriane Vélot contributed equally to this work.

Running head: Spin tip-based sample preparation for MS analysis

Avant-propos

Au cours de mon doctorat, j'ai eu l'opportunité de participer à la rédaction d'un chapitre de livre de la collection *Methods in Molecular Biology*. Ce chapitre visait à décrire de façon accessible le protocole de préparation d'échantillons provenant de lignées cellulaires cancéreuses ou de biopsies de tumeurs pour les analyses de spectrométrie de masse. Ce protocole a été mis au point par le Dr N. Bisson et le Dr D. Andrew James. Le travail de rédaction a été effectué en proportion égale par la co-première auteure L. Vélot et moi-même, conjointement avec les Drs. James et Bisson. Ce chapitre a été inclus dans le livre *The Tumor Microenvironment*, édité par la Dre J. Ursini-Siegel et la Dre N. Beauchemin, paru en 2016. J'évalue ma contribution à cet article à 30%.

i. Summary/Abstract

A precisely controlled network of protein-protein interactions constitutes the basis for functional signaling pathways. This equilibrium is more often than not disrupted in cancer cells, by the aberrant expression or activation of oncogenic proteins. Therefore, the analysis of protein interaction networks in cancer cells has become crucial to expand our comprehension of the molecular underpinnings of tumor formation and progression. We describe here a protocol for sample preparation for mass spectrometry (MS) analysis of signaling complexes following the affinity purification of a protein of interest from a cancer cell line or a solid tumor. In particular, we provide a spin tip-based protease digestion procedure that offers a more rapid and controlled alternative to other gel-based and gel-free methods. This sample preparation protocol represents a useful strategy to identify protein interactions and to gain insight into the molecular mechanisms that contribute to the cancer phenotype.

ii. Keywords

Protein interactions, mass spectrometry, sample preparation, tryptic digestion, spin tip.

1. Introduction

Intercellular communication is a critical feature of multicellular organisms. The signaling pathways that convey messages are commonly organized via inducible protein-protein interactions. This constitutes the basis for large, complex and dynamic signaling networks whose assembly and dismantling must be highly coordinated [1]. In humans, activation of these pathways at inappropriate locations or times can have disastrous consequences such as cell transformation and cancer [2].

The heterogeneity of both the genomic landscape and the cancer cell phenotype, within a given tissue, highlight the complexity of the disease. It has become clear that phenotypes are not simply the result of a mutation in a single gene but rather reflect the interplay between a number of molecular interactions. In that respect, network-based approaches have become crucial for our understanding of the molecular underpinnings of tumor formation and progression [3,4].

The analysis of protein-protein interactions within signaling networks using affinity purification followed by MS is one of the best suited methods to identify proteins that associate together directly or indirectly under physiological conditions, in normal and cancer cells [5,6]. We provide here a protocol for sample preparation for MS analysis of signaling complexes following the affinity purification of a protein of interest from a cancer cell line or solid tumor tissue.

Sample preparation often is an underestimated step in mass spectrometry analyses. Most of the current protocols have the drawbacks of (1) being performed following gel electrophoresis, (2) requiring a long incubation time with trypsin and (3) necessitating an additional cleanup step prior to MS analysis. Here, we describe a rapid, simple and reproducible method for gel-free sample preparation supporting mass spectrometry analysis of proteins, based on the utilization of spin tips. The digestion of protein samples directly on a chromatographic support allows for (1) gel-free digestion of a wide variety of samples, (2) a significantly shorter time of incubation with the protease and (3) simultaneous purification

and desalting of the sample. Moreover, the preparation of samples as described here leads to high reproducibility, as the fixed capacity of the chromatographic medium limits the amount of protein to be processed. This approach has been successfully utilized to identify phosphorylation sites on a protein of interest [7], to characterize interaction partners following affinity purification [8,9] and to investigate signaling network dynamics in transformed cells [10]. The method is also suitable for preparation of samples from tumor tissues for proteomic analyses.

2. Materials

In order to avoid contamination with keratins, it is recommended to handle materials with clean gloves.

2.1. Tissue culture and protein extraction

1. LNCaP human prostate adenocarcinoma cells (or another cancer cell line, or tumor tissue).
(See Note 1)
2. RPMI 1640 with L-glutamine culture medium supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS).
3. Phosphate buffered saline (PBS): 137 mM sodium chloride (NaCl), 2.7 mM potassium chloride (KCl), 10 mM sodium phosphate dibasic (Na_2HPO_4), 1.8 mM potassium phosphate monobasic (KH_2PO_4).
4. Cell lysis buffer: 20 mM Tris pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), 1% NP-40 (Igepal), 0.5% sodium deoxycholate, 10% glycerol. In order to prevent protein degradation, the buffer is supplemented with 1.5 μM aprotinin, 20 μM leupeptin, 15 μM pepstatin and 1 mM phenylmethylsulfonylfluoride (PMSF) just before use. If required, phosphatase inhibitors may also be added (e.g. 10 mM β -glycerophosphate, 50 mM sodium fluoride, 10 mM sodium pyrophosphate).

2.2. Affinity purification and sample elution

1. Affinity resin (to be selected according to the antibody required) (See Note 2)
2. Cell lysis buffer (as in 2.1)
3. Wash buffer: 20 mM Tris, pH 7.4 (may be supplemented with protease and phosphatase inhibitors, if required)
4. Elution solution: 50 mM phosphoric acid, pH 1.5-2

2.3. Protein digestion on chromatography medium in a spin tip

The reagents listed below should be handled with care to avoid contamination with keratins. Buffers should be diluted in high-pressure liquid chromatography (HPLC)-grade water.

1. A 10 µL pipette tip with a 0.6 µL bed of strong cation chromatography medium (SCX) fixed at its end (e.g. Millipore ZipTip®) with adaptor.
2. Conditioned SCX resin in water: Polysulfoethyl A, particle size 12 µm, pore size 300 Å (optional)
3. 10 mM potassium phosphate buffer, pH 3.0
4. HPLC grade water
5. 100 mM tris(2-carboxyethyl)phosphine (TCEP) in 100 mM Tris, pH 9.0
6. Sequencing grade modified trypsin or other protease
7. 100 mM iodoacetamide (light-sensitive, keep in the dark)
8. 200 mM Tris, pH 8.0
9. 2% formic acid

3. Methods

3.1. Tissue culture and protein extraction

1. Grow LNCaP cells to 90% confluence in 10 cm petri dishes in RPMI medium with L-glutamine supplemented with 10% fetal bovine serum, at 37 °C in a 5% CO₂ controlled atmosphere (see Note 3).

2. Carefully place the dishes on ice. Rinse cells once with 10 mL ice-cold PBS to remove any trace of culture medium.
3. Add 1 mL of cell lysis buffer per 10 cm dish (see Note 4). Lift cells off the plate using a scraper and harvest lysate in a 1.5 mL tube. Incubate for 20 minutes at 4 °C; mixing is optional (see Note 5).
4. Centrifuge at >15,000g for 20 minutes at 4 °C to remove insoluble material.
5. Collect supernatant in a new tube. Keep the lysate on ice for immediate use, or store at -80 °C. A small fraction of the lysate will be required to determine protein concentration (e.g. using bicinchoninic acid (BCA) assay) and for control experiments, if required (e.g. Western blotting analysis).

3.2. Affinity purification and sample elution

1. Prepare the required amount of affinity resin (see Note 6) by washing with cell lysis buffer (or PBS) three times, according to the manufacturer's recommendations (see Note 7).
2. In a new tube, mix 20 mg of cell lysate to the required amount of pre-washed affinity resin (see Note 8). Rotate the tubes at 4 °C for 90 minutes (see Note 9).
3. Pellet beads by centrifugation at 200g for 2 minutes at 4 °C (see Note 10). A fraction of the post-purification lysate may be kept to confirm that this step was successful. Remove supernatant and resuspend resin in 900 µL of lysis buffer by gently inverting the tubes a few times. Repeat this wash step two times.
4. Pellet the beads by centrifugation at 200g for 2 minutes at 4 °C. Remove supernatant and add 900 µL of wash buffer to resuspend the pelleted beads. Repeat once. This step is critical in removing salts and detergents, which are not compatible with later steps (see Note 11). After the last wash, aspirate as much wash buffer as possible, without disturbing the resin.
5. Add 100 µL of elution solution to the beads. Incubate at 4 °C with 1,000rpm agitation for 10 minutes (see Note 12).
6. Pellet beads by centrifugation at 200g for 2 minutes at 4 °C. Keep supernatant by transferring to a new tube. Repeat the elution twice and pool the three eluates in a single tube (see Note 13).

7. Centrifuge the pooled elutions at >15,000g for 1 minute at 4 °C, then transfer the supernatant to a new 1.5 mL tube while avoiding to transfer any residual beads. This latter step is crucial. Sample can be stored at -80 °C for later use (see Note 14).

3.3. Protein digestion on chromatography medium in a spin tip

1. Fit a 10 µL pipette tip with a 0.6 µL bed of strong cation chromatography medium (SCX) fixed at its end with no dead volume (e.g. Millipore ZipTip®, see Note 15) into a 1.5 mL standard collection tube, using an adaptor (see Note 16) (Figure 1).
2. Wash column with 80 µL of potassium phosphate buffer. Centrifuge at 200g for 2 minutes at a time until all buffer goes through the column. Discard the flow-through. Repeat this wash step twice.

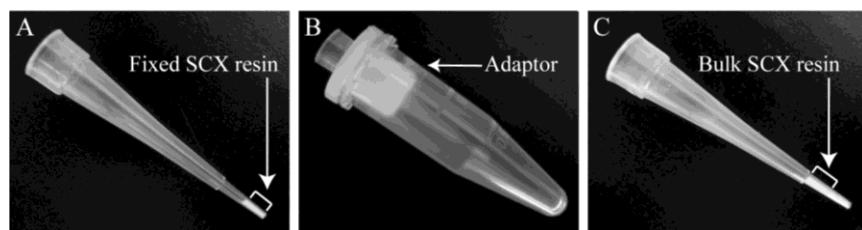


Figure Annexe 1. Spin tip-based protein digestion setup. (a) A 10 µL spin tip with a bed of 0.6 µL of fixed SCX resin at its end is shown. (b) The spin tip fits in a 1.5 mL tube with an adaptor. (c) Conditioned SCX resin can be added to the spin tip to increase column capacity.

3. Load protein sample (H_3PO_4 eluates from 3.2) on spin tip by centrifugation at 200g for 2 minutes of a volume of 80 µL at a time (see Note 17). Repeat this step until the protein sample is completely loaded (see Note 18). You may keep the flow-through and analyze a fraction of it to verify that all proteins have bound the column.
4. Wash column (as in step 2) with 60 µL of potassium phosphate buffer.
5. Wash column with 30 µL of HPLC-grade water.
6. Transfer the column in a new 1.5 mL collection tube.
7. Incubate with 100 mM TCEP for 30 minutes at room temperature. To achieve this, pipette 2-3 µL of solution and centrifuge for 1-2 seconds, until a tiny droplet (representing less than

the complete volume of solution) is seen at the bottom of the collection tube. Do not let it go through completely (see Note 19) (Figure 1).

8. Wash column with 60 μ L of HPLC grade water.
9. Transfer spin tip into a new collection tube.
10. Resuspend MS grade trypsin in 100 mM Tris pH 8.0, 10 mM iodoacetamide in order to get to a final concentration of 2 mg/mL (see Note 20).
11. Put trypsin solution on the resin as detailed in step 7 above (see Note 21) (Figure 1). Incubate with trypsin solution for 1-2 hours at room temperature, in the dark (see Note 22).
12. Elute digested sample into a new collection tube by washing column with 5 μ L of HPLC-grade water (see Note 23). Keep the flow-through; this is the digested sample. Repeat twice and pool eluates; total volume should be 15 μ L.
13. Acidify the eluate by adding 1 μ L of 2% formic acid.
14. Store at -80 °C until mass spectrometry analysis (see Note 24).

4. Notes

1. Negative controls should be planned to perform bioinformatics analysis of MS data.
2. The cell lysis buffer composition has to be compatible with the affinity resin that is selected.
3. The amount of cells to be grown is relative to expression level of the protein bait (also see Note 8).
4. The volume of lysis buffer to be used is determined from the size of the cell pellet and the expected total protein content, which are both dependent of the cell line that is utilized. Typically, a volume of 0.3 mL to 1 mL is adequate for a 10 cm culture plate.
5. Alternatively, proteins may be extracted from tumor tissue using the same lysis buffer. However, the tissue will require mechanical homogenization to achieve a complete lysis.
6. The selection of the affinity resin is made following the selection of the cell line that is utilized. For example, cells stably or transiently expressing an epitope-tagged protein (e.g. GFP, Flag, HA, Myc) will require an affinity resin that recognizes the epitope. On the other hand, non-engineered (parental) cell lines will necessitate custom antibody-immobilized beads to precipitate endogenous proteins.

7. The utilization of wide-bore pipette tips will facilitate resin transfer. Beads dilution in a larger volume (e.g. 100 µL per 10-20 µg of beads, per purification) will ensure that beads are distributed equally among all tubes, if several affinity purifications are performed simultaneously.
8. The amount of total protein to be used in each affinity purification procedure requires to be tested experimentally, as it is dependent of the bait protein expression level and the affinity of the antibody for the bait protein, among other factors. Better results are obtained when 0.5 to 1 µg of the bait protein is affinity-precipitated. In order to verify this, step 3 of section 3.2 may be followed by an extraction in Laemmli buffer to determine bait protein levels via SDS-PAGE using a BSA standard.
9. An incubation period of antibody-conjugated beads with cell lysates of 30 to 120 minutes is normally sufficient. A longer incubation period may lead to protein precipitation and to the identification of more contaminants as proteins interacting with the selected bait. Overnight incubations should be avoided. The volume in which the affinity purification is performed should not influence yields.
10. If magnetic beads are used, all centrifugation steps of the affinity purification procedure are replaced by placing the tube on the magnet for 1 minute.
11. For wash steps, a prolonged incubation is not required.
12. The utilization of a temperature-controlled agitator is suggested but not required. Alternatively, tap the bottom of the tube gently a few times to resuspend beads every 2-3 minutes. The low pH may lead to a change of color of the beads; this will not affect the subsequent steps. As elution of bait protein complexes using a peptide antigen is challenging and not compatible with gel-free tryptic digestion protocols for MS analysis, this is a significant advantage of this method.
13. This elution method was successfully performed with M2 (Flag) affinity resin, protein A sepharose, streptavidin agarose and a variety of magnetic beads coupled to antibodies, peptides or chemicals.
14. Proteins are stable for weeks in elution solution, if stored at -80 °C. Samples may be kept to perform spin tip digestion (section 3.3) simultaneously.
15. While Millipore ZipTip®-SCX are easy to use, Glygen TopTips are also suitable and available with or without chromatography media.

16. The capacity of the SCX resin is estimated to be 0.5 µg of protein per µL of resin. The amount of SCX in the spin tip may be adjusted by adding resin (Polysulfoethyl A, particle size 12 µm, pore size 300 Å) to the spin tip. This can be achieved by pipetting conditioned SCX resin resuspended in water (in a 1:10 resin:water ratio), followed by centrifugation at 200g for 2 minutes or until the resin is packed. The equivalent of 0.5 to 1.5 µL of resin may be added, for a total capacity around 1 µg of protein on the spin tip (Figure 1). This contributes to limit the amount of protein to be digested, thus increasing reproducibility of the tryptic digestion step and helping to estimate sample concentration.

17. The spin tip tryptic digestion protocol is also compatible with digestion of whole cell extracts for total proteome analysis (i.e. without the affinity purification step). The protein sample will need to be acidified prior to binding to the SCX resin. The reproducibility of the protocol described here was not specifically tested for this application.

18. A highly concentrated protein sample to be loaded on the spin tip (i.e. above 2-3 µg) or one that is contaminated with beads from the affinity purification step may block the spin tip. To overcome this problem without compromising samples, it is possible to centrifuge at a higher speed (up to 400-500g, although this may block the column even further) or to use a closed glass capillary to stir gently the resin inside the spin tip.

19. There should also be a small volume of the TCEP solution that is visible above the beads. If the complete volume inadvertently goes through the spin tip, this step may be repeated until successfully achieved.

20. Iodoacetamide is an alkylation agent that irreversibly transforms cysteines to prevent the reformation of disulfide bonds. It may be omitted, due to the rareness of cysteine in protein sequences. If it is used, it will increase the mass of a cysteine from 103.01 Da to 160.03 Da for a carboxyamidomethylcysteine. Databases should be searched accordingly.

21. It is crucial to ensure that the trypsin solution is on the column but does not go through completely. Iodoacetamide is light sensitive; therefore spin tips should be incubated in the dark (e.g. wrapping the tube rack in foil). The high concentration of trypsin that is utilized in this protocol and the small reaction volume allow an efficient digestion of proteins within 1 to 2 hours.

22. The protocol is also compatible with proteases other than trypsin, at neutral pH.

23. Elution may also be performed in freshly prepared 200 mM ammonium bicarbonate, pH 8.0. This may be directly analyzed by mass spectrometry following acidification with formic acid to 1% final, or may require complete evaporation and resuspension in 0.1% formic acid in water.
24. The digested sample may be kept at -80 °C for a few weeks. It may be directly analyzed by LC/MS-MS as it is, without evaporation/resuspension or further purification.

Acknowledgements

The spin tip digestion method was initially developed in the laboratory of Dr. Tony Pawson at the Lunenfeld-Tanenbaum Research Institute, with input from Karen Colwill, Brett Larsen and Vivian Nguyen. This work was supported by grants from the Canadian Institutes for Health Research (MOP-130335) and the Canada Foundation for Innovation (to N.B.). A.B. and L.V. hold Pierre J. Durand scholarships from Université Laval Faculty of Medicine, and L.V. a Université Laval Cancer Research Centre scholarship. N.B. is a scholar of the Fonds de Recherche du Québec-Santé (in partnership with the Quebec Breast Cancer Foundation) and holds a Canada Research Chair in Cancer Proteomics.

5. References

1. Gibson TJ (2009) Cell regulation: determined to signal discrete cooperation. *Trends Biochem Sci* 34 (10):471-482
2. Pawson T (1995) Protein modules and signalling networks. *Nature* 373 (6515):573-580
3. Goh KI, Cusick ME, Valle D, Childs B, Vidal M, Barabasi AL (2007) The human disease network. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104 (21):8685-8690. doi:10.1073/pnas.0701361104
4. Menche J, Sharma A, Kitsak M, Ghiassian SD, Vidal M, Loscalzo J, Barabasi AL (2015) Disease networks. Uncovering disease-disease relationships through the incomplete interactome. *Science* 347 (6224):1257601. doi:10.1126/science.1257601
5. Lambert JP, Ivosev G, Couzens AL, Larsen B, Taipale M, Lin ZY, Zhong Q, Lindquist S, Vidal M, Aebersold R, Pawson T, Bonner R, Tate S, Gingras AC (2013) Mapping differential interactomes by affinity purification coupled with data-independent mass spectrometry acquisition. *Nat Methods* 10 (12):1239-1245. doi:10.1038/nmeth.2702

6. Dunham WH, Mullin M, Gingras AC (2012) Affinity-purification coupled to mass spectrometry: basic principles and strategies. *Proteomics* 12 (10):1576-1590. doi:10.1002/pmic.201100523
7. Gamblin CL, Hardy EJ, Chartier FJ, Bisson N, Laprise P (2014) A bidirectional antagonism between aPKC and Yurt regulates epithelial cell polarity. *The Journal of cell biology* 204 (4):487-495. doi:10.1083/jcb.201308032
8. Bisson N, James DA, Ivosev G, Tate SA, Bonner R, Taylor L, Pawson T (2011) Selected reaction monitoring mass spectrometry reveals the dynamics of signaling through the GRB2 adaptor. *Nat Biotech* 29 (7):653-658.
9. So J, Pascalescu A, Dai AY, Williton K, James A, Nguyen V, Creixell P, Schoof EM, Sinclair J, Barrios-Rodiles M, Gu J, Krizus A, Williams R, Olhovsky M, Dennis JW, Wrana JL, Linding R, Jorgensen C, Pawson T, Colwill K (2015) Integrative analysis of kinase networks in TRAIL-induced apoptosis provides a source of potential targets for combination therapy. *Sci Signal* 8 (371):rs3. doi:10.1126/scisignal.2005700
10. Filteau M, Diss G, Torres-Quiroz F, Dube AK, Schraffl A, Bachmann VA, Gagnon-Arsenault I, Chretien AE, Steunou AL, Dionne U, Cote J, Bisson N, Stefan E, Landry CR (2015) Systematic identification of signal integration by protein kinase A. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112 (14):4501-4506. doi:10.1073/pnas.1409938112