

## MÉCANISMES MOLÉCULAIRES DE LA TUBULOGENÈSE

par

L.G. CANTLEY\*

Le développement du rein mature survient par une série d'étapes d'induction coordonnées entre le canal de Wolff et une collection de cellules mésenchymateuses à son extrémité caudale appelée le mésenchyme métanéphrique. Cette étape commence par l'expression du GDNF (*glial-derived neurotrophic factor*) par le mésenchyme métanéphrique activant ainsi le récepteur c-ret dans les cellules du canal de Wolff et initiant le bourgeonnement du bourgeon urétéral. Ceci est suivi par la production locale de facteurs qui régulent positivement, FGF (*fibroblast growth factor*), pleiotrophine, *hepatocyte growth factor* (HGF), *epidermal growth factors* (EGF, TGF $\alpha$ ) [1-4], et/ou négativement *bone morphogenic proteins* (BMPs), inhibiteur des metalloprotéinases (TIMP2) endostatine [5-7] la division du bourgeon urétéral, la migration cellulaire et l'élongation tubulaire pour former le système collecteur du rein. Au même moment, d'autres facteurs tels que la lipocaline, FGF, et le *leukemia inhibitory factor* (LIF) sont produits aux extrémités des branches du bourgeon urétéral et initient la condensation du mésenchyme métanéphrique pour former des agrégats péritubulaires, suivis par la transition mésenchyme-épithélium de ces cellules et la formation des parties les plus proximales du néphron (du glomérule jusqu'au tube contourné distal) [8]. La fusion de ces deux segments tubulaires, d'origine distincte, conduit à la formation du néphron fonctionnel mature.

Une fois complètement développés, les épithélies tubulaires du néphron représentent une monocouche cellulaire relativement quiescente. Cependant, à l'occasion de stress, ces cellules épithéliales sont capables de subir des altérations morphologiques et fonctionnelles. Ces réponses au stress produisent à la fois une adaptation et une protection pour la fonction tubulaire, permettant l'hypertrophie en réponse à un besoin de transport accru et permettant la réparation tissulaire suite

\* Yale University School of Medicine, New Haven.

à de multiples types d'agression. La nécrose tubulaire aiguë reste la cause principale d'insuffisance rénale chez les patients hospitalisés et la mortalité associée avec cette situation, quand elle requiert l'hémodialyse, reste élevée (50 à 80 p. 100) malgré les progrès récents dans les techniques d'épuration extrarénale [9].

L'expression de nombreux facteurs de croissance et/ou de leurs récepteurs est augmentée en cas d'agression tubulaire aiguë et plusieurs de ces facteurs de croissance, notamment HGF, EGF, IGF1 (*insuline-like growth factor 1*) ont la capacité d'améliorer l'évolution de l'insuffisance rénale aiguë, quand elles sont données à des doses pharmacologiques, dans des modèles animaux [10-14] ; cependant, les essais chez l'homme n'ont pas encore été concluants [15]. Comme nous l'avons mentionné, ces mêmes facteurs de croissance sont exprimés dans le rein en développement et semblent jouer un rôle dans la formation normale du système collecteur et/ou du néphron. De nombreux événements morphologiques qui surviennent durant le développement, tels que la régulation des interactions cellulaires et cellules-matrices, la migration, la prolifération, la transition mésenchyme-épithélium, sont récapitulés à certain degré, durant la réparation d'une agression tubulaire [16]. Ceci a conduit à l'utilisation de modèles de culture cellulaire afin d'identifier les voies de signalisation activées par ces facteurs de croissance, dans l'espoir de comprendre la régulation de ces voies et quels événements elles contrôlent en aval pour mieux appréhender non seulement les défauts survenant lors du développement rénal, mais également pour définir des moyens d'intervention ciblés et efficaces pour augmenter la réparation tubulaire.

## TUBULOGENÈSE *IN VITRO*

Quand les cellules tubulaires épithéliales sont mises en culture à faible densité, elle s'assemblent en petits îlots et prolifèrent pour former une monocouche épithéliale ayant un aspect pavé (*cobblestone*). Cependant, si ces cellules sont cultivées dans une matrice en 3 dimensions telle que le collagène de type 1 ou le Matrigel, elles se divisent pour former un agrégat tridimensionnel de cellules et à un certain point critique de leur densité, développent une lumière centrale entourée par une couche kystique de cellules polarisées (fig. 1A). Si les cellules sont cultivées dans une matrice tridimensionnelle en présence de facteurs de croissance spécifiques tels que HGF ou les ligands de l'EGF récepteur, elles changent d'une morphologie sphérique vers une morphologie allongée et étendent des branchements à partir du corps principal de la cellule dans les premières 12 à 18 heures de culture. Quand ces branchements établissent des contacts avec les branchements provenant de cellules adjacentes, des divisions cellulaires se produisent le long d'un axe plutôt que sous forme d'agrégat sphérique. Ceci résulte en un cordon de cellules formant un tubule ramifié. Ainsi, alors que ces cellules prolifèrent jusqu'à un point de densité critique, une lumière centrale apparaît récapitulant la formation tubulaire (fig. 1B). Ainsi, l'arrangement d'une couche monocellulaire avec une lumière centrale semble être une propriété inhérente des cellules épithéliales tubulaires, des facteurs de croissance spécifiques jouant un rôle déterminant dans l'arrangement morphologique de cette structure luminale.

De façon intéressante, durant ces expériences de culture *in vitro*, des structures variées peuvent s'observer, de prédominance kystique, sous certaines conditions,

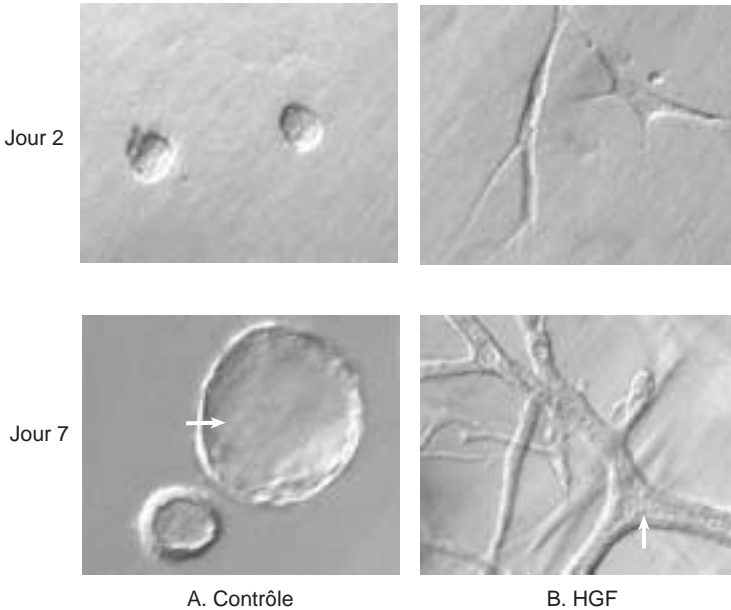


FIG. 1. — Tubulogenèse *in vitro*. Les cellules immortalisées IMCD sont cultivées en suspension dans un mélange de collagène de type I et de Matrigel en présence de sérum de veau fœtal 1 p. 100 (A) ou de sérum de veau fœtal 1 p. 100 + HGF (40 ng/ml) (B). Les structures observées au jour 2 sont faites de 2-4 cellules alors que les structures observées au jour 7 contiennent 50 à 100 cellules. La lumière centrale est désignée par la flèche blanche.

à une prédominance de tubules en présence de facteurs de croissance tubulogéniques. La capacité d'un facteur de croissance donné à induire une structure tubulaire après 4-5 jours de culture est corrélée avec la capacité à induire une ramification après 24-48 heures de culture, permettant de quantifier le potentiel tubulogénique de facteurs de croissance en déterminant le nombre de ramifications par cellule.

Parmi les facteurs de croissance qui ont été étudiés dans ce processus, HGF est remarquable de par ses effets marqués sur la morphologie des cellules épithéliales et l'induction de tubulogenèse *in vitro* [17], expliquant ainsi l'intérêt d'étudier les voies de signalisation induites par l'HGF pour mieux comprendre la tubulogenèse. La plupart de ces travaux ont été conduits dans des systèmes de culture cellulaire, utilisant des cellules d'origine proximale (LLCPK, OK) et/ou d'origine distale (MDCK, mIMCD-3). La stimulation des cellules épithéliales tubulaires par l'HGF résulte dans des changements morphologiques spécifiques qui dépendent des interactions cellule-cellule et cellules-matrices. En suspension, HGF induit un attachement cellulaire plus rapide au substrat de culture et augmente l'étalement cellulaire [8]. Sur les cellules déjà adhérentes au substrat de culture, HGF induit une perte des interactions cellule-cellule et stimule la dispersion cellulaire et la migration expliquant l'autre nom donné à l'HGF (*scatter factor*). Par opposition, ainsi que souligné ci-dessus, les cellules suspendues dans une matrice sont en contact avec les cellules adjacentes et forment une structure tubulaire allongée

quand elles sont traitées par l'HGF. Ces différentes réponses à un même facteur de croissance démontrent que les voies de signalisation intracellulaire contrôlant la morphologie des cellules tubulaires doivent recevoir des informations multiples de la surface cellulaire, incluant les récepteurs de facteurs de croissance eux-mêmes, les sites d'interaction cellule-cellule et les sites d'interaction cellule-matrice.

## VOIES DE SIGNALISATION PAR LE RÉCEPTEUR DE L'HGF

Le récepteur de l'HGF, de haute affinité, situé à la surface des cellules est le récepteur tyrosine kinase c-met qui est exprimé essentiellement sur toutes les cellules tubulaires épithéliales de l'organisme incluant le rein, le poumon, l'intestin, le pancréas et le sein [19, 20]. Ce récepteur comporte une sous-unité  $\alpha$ -extracellulaire liée par un pont disulfure à une sous-unité  $\beta$ -transmembranaire. En plus de son récepteur à haute affinité, l'HGF peut aussi lier les heparanes sulfate protéoglycanes à la surface cellulaire tels que syndecans et glypicans. La présence de ce récepteur de basse affinité pour des facteurs liant l'héparine tels que l'HGF ou le FGF est critique pour leur action, ce qui est illustré par la perte de leur activité lorsqu'on retire les heparanes sulfate protéoglycanes à la surface des cellules [21, 22]. La liaison du HGF à son récepteur c-met entraîne l'homodimérisation du récepteur et la cross-phosphorylation des domaines tyrosine kinase. La transduction du signal en aval du récepteur dépend principalement de la phosphorylation de deux résidus tyrosine dans la partie carboxyterminale, Y<sup>1349</sup> et Y<sup>1356</sup> [23, 24]. Ces résidus phosphorylés servent de cible de liaison de haute affinité pour recruter des molécules adaptatrices critiques pour les effets morphogéniques de l'HGF incluant PI-3 kinase, PLC $\gamma$ , src, et grb2. L'association à grb2 entraîne l'activation des MAPK ainsi qu'une association unique avec la molécule adaptatrice Gab1 [25]. L'association avec Gab1 est essentielle pour les effets tubulogéniques mais non l'induction de la migration par HGF [25, 26].

## VOIES PI-3 KINASE, PKC ET PLC $\gamma$ DANS LE REMANIEMENT DU CYTOSQUELETTE

Une des molécules les plus étudiées qui est activée par le récepteur c-met est la phospho-inositide 3-kinase (PI 3K) [13, 27]. Cette molécule hétérodimérique comprend une sous-unité de 85 kDa régulatrice (p85) et une sous-unité catalytique de 110 kDa (p110). La phosphorylation de séquences protidiques contenant des résidus tyrosine-x-x-méthionine (YxxM) procure des sites de liaison de haute affinité pour les deux domaines SH2 de p85, recrutant ainsi PI 3K et activant la sous-unité catalytique. La PI 3K phosphoryle le phosphatidylinositol 4,5 bisphosphate (PI<sub>4,5</sub>P<sub>2</sub>) en position 3 générant le PI<sub>3,4,5</sub>P<sub>3</sub> dans la couche lipidique à proximité du récepteur. PI<sub>3,4,5</sub>P<sub>3</sub> agit ensuite comme un site de recrutement pour activer d'autres protéines à la membrane cellulaire incluant les kinases phospho-inositides dépendantes (PDK) et Akt/PKB (protéine kinase B). L'association de PI 3K avec c-met

est médiée par la séquence <sup>1349</sup>YVHVNATYVNV dans la partie c-terminale de c-met [26, 28] qui peut soit lier directement les domaines SH2 de PI 3K (mais avec une faible affinité) ou médier indirectement l'association de PI 3K par Gab1 [25].

La capacité de HGF à induire des changements de morphologie cellulaire et à altérer les interactions avec la membrane basale montre que la signalisation par c-met doit réguler la dissociation et la formation de cytosquelette d'actine durant l'émission de prolongements cellulaires et la migration cellulaire. Pour étudier un rôle possible de PI 3K dans ce processus, nous avons examiné la migration et la ramification des cellules IMCD en utilisant des inhibiteurs de PI 3K ou une activation sélective de PI 3K. L'inhibition de PI 3K par la wortmannine ou le composé LY294002 a eu comme effet d'inhiber la migration induite par le HGF ainsi que le processus de ramification cellulaire et la formation tubulaire, démontrant que cette voie de signalisation est nécessaire pour la morphogenèse induite par HGF [29]. De plus, ces cellules IMCD exprimant un récepteur PDGF mutant qui active seulement la PI 3K ont migré en réponse au PDGF démontrant que la signalisation par PI 3K est à la fois nécessaire et suffisante pour induire cette réponse morphogénique. Par contre, la réponse plus complexe que constitue la tubulogenèse n'était pas activée par l'expression des récepteurs PDGF sauvages ou mutants dans les cellules IMCD démontrant que l'activation des PI 3K n'est pas suffisante pour induire ce phénotype et confirmant la nature unique des signaux engagés en aval du récepteur c-met.

L'examen des mécanismes induits par PI 3K sur la morphologie cellulaire et la migration ont montré que l'addition de  $PI_{3,4,5}P_3$  aux cellules, indépendamment d'une activation du récepteur ou de la PI 3K elle-même, était suffisante pour induire la migration, montrant bien que ce n'est pas l'enzyme PI 3K elle-même mais plutôt la présence de  $PI_{3,4,5}P_3$  à la membrane cellulaire qui était l'élément décisif [30]. L'observation des cellules en temps réel a montré que celles traitées par  $PI_{3,4,5}P_3$  exhibaient d'importantes « boursoufflures » en bordure des cellules, suggérant que l'activation de PI 3K est spécifiquement impliquée dans le réarrangement du cytosquelette. La démonstration que ces lipides servent de sites de recrutement pour d'autres protéines à la surface cellulaire, nous a conduit à rechercher des protéines candidates que  $PI_{3,4,5}P_3$  pourrait réguler. Les protéines kinases C (PKC) sont des sérines/thréonines kinases qui sont activées après recrutement à la membrane et sont des régulateurs importants des réarrangements du cytosquelette d'actine de par la phosphorylation de substrats tels que les MARCKS [31]. La capacité des PKC activées à stimuler la migration cellulaire nous a conduit à étudier le rôle des isoformes de PKC dans la migration cellulaire induite par PI 3K. Ces expériences ont révélé que  $PI_{3,4,5}P_3$  conduit à l'activation des PKC à la membrane cellulaire (avec une activation préférentielle des isoformes des PKC-calcium indépendantes telles que PKC $\epsilon$ ) et que l'inhibition des PKC bloquait complètement la boursoufflure des cellules et la migration cellulaire induites par PI 3K [30, 32].

Durant les études utilisant les récepteurs du PDGF mutants, nous avons noté que la co-activation de PI 3K et de la phospholipase C $\gamma$  (PLC $\gamma$ ) entraînait une augmentation de la migration cellulaire comparée à l'activation de PI 3K seule, et que l'inhibition de PLC $\gamma$  diminuait très nettement la migration cellulaire. L'étude des mécanismes impliqués dans cet effet a révélé que la production de  $PI_{3,4,5}P_3$  augmentait la production d'inositol triphosphate (IP3) induite par PLC $\gamma$  et que l'augmentation de calcium cytosolique médiée par l'activation de PLC $\gamma$  augmentait deux fois s'il y avait une co-activation de PI 3K [33, 34]. De plus, nous avons montré que

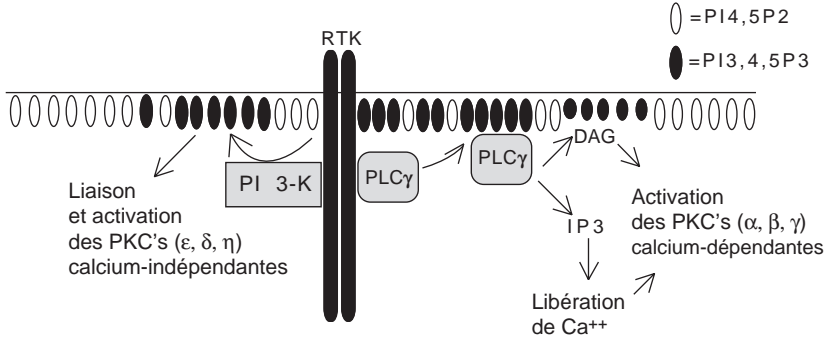


FIG. 2. — Modèle montrant le rôle de l'activation de PI 3K, PLC $\gamma$  et PKC. L'activation d'un récepteur tyrosine kinase (RTK) tel que c-met conduit à la fixation et à l'activation de PI 3K et de PLC $\gamma$ . La PI 3K phosphoryle PI<sub>4,5</sub>P<sub>2</sub> à la membrane pour produire du PI<sub>3,4,5</sub>P<sub>3</sub> à proximité du récepteur. PI<sub>3,4,5</sub>P<sub>3</sub> sert de site de liaison et active directement les isoformes des PKC calcium-indépendantes et également entre en compétition pour retirer PLC $\gamma$  du récepteur tyrosine kinase et le cibler à la membrane. PLC $\gamma$  peut alors hydrolyser PI<sub>4,5</sub>P<sub>2</sub> en diacylglycerol et IP<sub>3</sub> activant ainsi les isoformes des PKC calcium-dépendantes ainsi que d'autres protéines régulées par le calcium et impliquées dans le réarrangement du cytosquelette.

PI<sub>3,4,5</sub>P<sub>3</sub> entrait en compétition avec le récepteur activé pour lier les domaines SH2 de PLC $\gamma$  suggérant ainsi que PI<sub>3,4,5</sub>P<sub>3</sub> peut médier le recrutement de la PLC $\gamma$  activée du récepteur à la couche bilipidique où l'enzyme est en contact direct avec son substrat, le PI<sub>4,5</sub>P<sub>2</sub> (fig. 2). Cette activation accrue de PLC $\gamma$  entraîne une production accrue de diacylglycérol et le relargage de calcium provoquant ainsi une activation des protéines kinases C-calcium dépendantes ainsi que d'autres protéines calcium dépendantes impliquées dans la régulation du cytosquelette d'actine telle que la gelsoline. Ainsi, il apparaît que l'activation de la voie PI 3K par des récepteurs tels que c-met est un élément-clé dans la régulation du réarrangement du cytosquelette nécessaire pour induire des modifications morphologiques cellulaires mais un stimulus insuffisant pour produire une vraie formation tubulaire.

## TRANSDUCTION DU SIGNAL PAR HGF ET COMPLEXE D'ADHÉSION FOCALE

En plus des réarrangements du cytosquelette d'actine, il est clair que le HGF doit aussi réguler les sites d'adhésion cellule-matrice extracellulaire. Dans les premiers stades de la migration cellulaire de la tubulogenèse, HGF induit de longues extensions cellulaires qui interagissent avec la matrice environnante et guident soit la migration du corps entier de la cellule, soit le contact avec des prolongements de cellules adjacentes, formant ainsi un axe linéaire et finalement la formation de tubules [29, 35]. Les travaux du groupe de Nigam ont montré que la capacité d'HGF d'induire ces changements morphologiques était accrue en présence de composants de la matrice extracellulaire tels que la fibronectine et la laminine alors

qu'ils étaient diminués en présence de collagène de type IV et de vitronectine [36]. Plus récemment, nous avons montré que l'HGF pouvait entraîner une adhésion rapide des cellules en suspension sur la fibronectine ou le collagène de type I mais pas sur la laminine, le collagène de type IV ou la poly-L-lysine [18]. Cette augmentation de l'adhésion cellulaire induite par l'HGF nécessite l'étalement cellulaire, un processus qui dépend d'une interaction finement régulée entre un groupe de protéines cytosoliques et transmembranaires aux sites de contact cellules-matrices, appelé le complexe d'adhésion focale.

Les contacts cellule-matrice sont formés par des interactions entre des protéines transmembranaires appelées les intégrines et la matrice extracellulaire, qui sont régulées par un groupe de protéines intracellulaires incluant taline,  $\alpha$ -actinine, FAK (*focal adhesion kinase*), la kinase liée aux intégrines (ILK), vinculine et paxilline [37]. Ces sites d'adhésion focale permettent l'attachement des filaments d'actine et ainsi dans leur forme mature, agissent pour stabiliser la structure cellulaire. Par opposition, pour que les cellules puissent se déplacer et changer de morphologie, les complexes d'adhésion focale doivent être réarrangés pour permettre une modification du cytosquelette, l'extension d'un processus cellulaire et la formation de nouveaux points d'adhésion focale à des sites distants. De nombreuses voies de signalisation (incluant les petites protéines liant le GTP, rho, rac et CDC 42, PI 3K, src et FAK) sont activées à la fois par l'engagement des intégrines et les facteurs de croissance extracellulaire.

La capacité d'HGF à réguler les sites de contact cellulaire a été démontrée dans des travaux étudiant l'attachement des cellules tumorales dans lesquelles HGF est capable de stimuler l'adhésion intégrine dépendante des cellules [38, 39]. Plusieurs hétérodimères d'intégrines et composants de la matrice extracellulaire jouent un rôle dans ce processus, incluant,  $\alpha 2\beta 1$ ,  $\alpha 3\beta 1$  et  $\alpha 6\beta 4$ , en conjonction avec le collagène de type I, la fibronectine et la laminine. Nous avons montré que plusieurs lignées cellulaires rénales tubulaires murines augmentaient en réponse à l'HGF leur adhésion à la fibronectine et au collagène de type I mais contrairement à ce qui a été montré dans les cellules carcinomateuses, l'adhésion à la laminine n'était pas augmentée [35]. L'examen minutieux dans le temps de l'adhésion stimulée par HGF nous a montré que l'HGF ne modifie pas l'attachement initial des cellules épithéliales tubulaires rénales mais augmente plutôt la vitesse d'étalement cellulaire. La distinction entre l'attachement cellulaire initial (qui est basé sur une activation des intégrines) et le processus plus complexe d'étalement et/ou migration (qui est basé sur le *turnover* des complexes d'adhésion focale et les changements de morphologie cellulaire qui en découlent) nous éclaire sur le processus de morphogenèse induit par l'HGF et suggère des protéines candidates spécifiques qui pourraient être impliquées dans l'adhésion cellulaire et régulées par HGF.

Deux protéines des complexes d'adhésion focale, FAK et paxilline, ont un rôle critique dans l'étalement et la migration cellulaire mais ne sont pas requises pour la simple adhésion cellulaire. Des fibroblastes qui n'expriment ni FAK ou paxilline sont capables d'une adhésion cellulaire presque normale mais ne peuvent s'étaler ou migrer en réponse à divers stimuli [40, 41]. De façon intéressante, les fibroblastes n'exprimant pas FAK forment plus de complexes d'adhésion focale que les cellules contrôles (basées sur la localisation de vinculine, actine et taline), suggérant que le recrutement de FAK aux complexes liaisons focales est important pour le *turnover* de ces complexes qui est nécessaire pour les changements de

morphologie cellulaire survenant durant l'étalement et la migration. Renforçant cette hypothèse, il est apparu que le processus de maturation des complexes d'adhésion focale et d'étalement cellulaire, requiert la phosphorylation sur des résidus tyrosine, à la fois de FAK et de paxilline [42, 43].

La paxilline est une protéine de 68 kDa qui sert d'adaptateur pour de multiples protéines des complexes d'adhésion incluant FAK, actopaxine, vinculine, paxilline kinase linker (PKL) et ILK [44, 45]. Les protéines interagissant avec la paxilline s'associent à des résidus uniques dans la partie aminoterminal de la paxilline appelée des domaines LD. La surexpression du domaine LD4 de la paxilline prévient l'association de celle-ci avec FAK et PKL et inhibe fortement la migration cellulaire [45], démontrant que le recrutement de ces protéines induite par la paxilline est critique pour le processus de modification morphologique de la cellule. Supportant également un rôle critique de la paxilline dans les processus de morphogénèse durant le développement, les souris paxilline  $-/-$  ne survivent pas après 8,5 jours de développement et ont de multiples anomalies incluant petites têtes, troncation de l'axe antéropostérieur et anomalies cardiaques [40], qui sont très similaires à celles observées chez les souris inactivées pour FAK [41].

FAK est une tyrosine kinase cytoplasmique qui est dirigée vers la formation de nouveaux complexes d'adhésion par son extrémité C-terminale comportant un domaine FAT (*focal adhesion targeting*) qui interagit avec la taline, la taline et la tensine. Le recrutement de FAK aux complexes d'adhésion entraîne l'activation de son domaine kinase et l'autophosphorylation sur la tyrosine 397 qui sert alors de site de liaison pour les domaines SH2 de la sous-unité p85 de PI 3K, src, PLC $\gamma$  et Grb7 [46, 47]. Une fois activée, FAK phosphoryle d'autres substrats tels que la paxilline et p130Cas (qui s'associe avec FAK par son domaine SH3). La stimulation par HGF induit la phosphorylation de FAK sur des résidus de tyrosine et augmente la liaison des complexes intégrines avec le cytosquelette d'actine [38, 48]. Lai et coll. ont montré que la surexpression de FAK entraînait une augmentation nette de la dispersion des cellules MDCK en réponse à l'HGF due à une augmentation de l'étalement cellulaire et de la migration cellulaire [49]. Ces travaux initiaux ont donc montré que la signalisation par FAK et paxilline avaient une importance primordiale dans l'étalement cellulaire et la migration. Cependant, les événements qui régulent leur recrutement aux complexes d'adhésion focale et qui déterminent ainsi quels complexes restent stables et lesquels sont soumis à un *turnover*, commencent à peine à émerger.

## HGF ET LA TRANSDUCTION DU SIGNAL PAR LES MAPK

À côté de son association à PI 3K et à PLC $\gamma$ , le récepteur c-met activé s'associe avec une protéine adaptatrice grb2 par le même site de tyrosine phosphorylée dans sa partie carboxyterminale. Grb2 a deux domaines SH3 qui permettent son association constitutive avec la protéine adaptatrice Gab1 et le facteur d'échange nucléotidique Sos, recrutant ainsi ces protéines au récepteur (fig. 3). Gab1 est une protéine de 110 kDa qui est phosphorylée par le récepteur c-met et sert à son tour à amplifier l'association de c-met avec PI 3K et PLC $\gamma$ , ainsi que la liaison à la tyrosine phosphatase SHP2, à la protéine adaptatrice Crk et, par son domaine

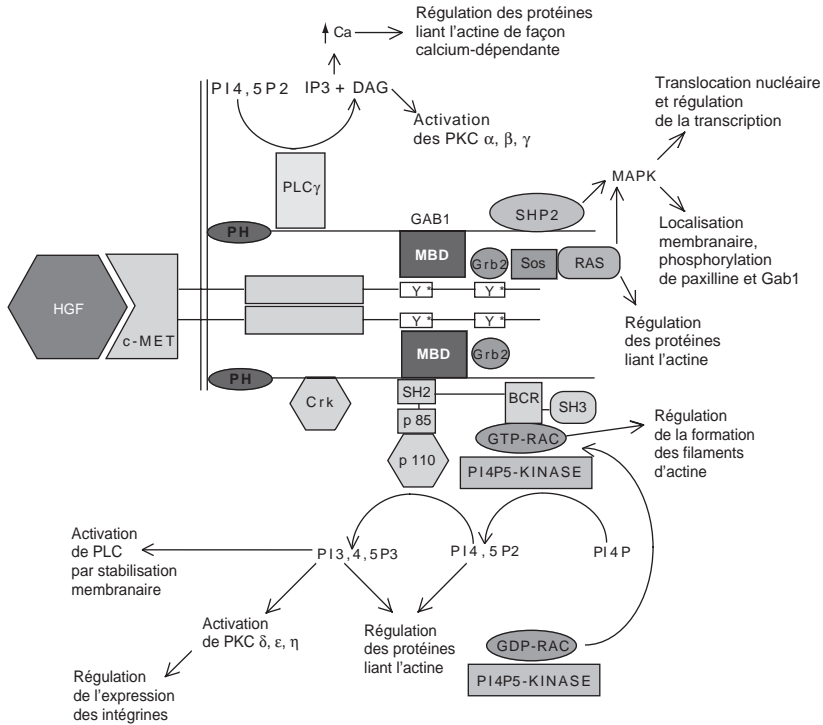


FIG. 3. — Transduction du signal par le récepteur de l’HGF c-met. L’activation du récepteur par la liaison de l’HGF entraîne une homodimérisation de c-met et une activation de ses domaines kinase avec secondairement phosphorylation de Y<sup>1349</sup> et Y<sup>1356</sup> dans la partie carboxyterminale. Ceci produit des sites de liaison à haute affinité pour des domaines SH2 de Grb2 et le domaine de liaison à met (MBD) de Gab1. Les domaines SH3 de Grb2 permettent l’association de c-met avec Gab1 par la liaison à un domaine riche en proline de Gab1, ainsi que le recrutement de Sos au récepteur activant ainsi la voie des MAPK. L’activation de ERK par cette voie peut entraîner ainsi la localisation nucléaire de ERK et l’activation transcriptionnelle ou la liaison localement de ERK à Gab1 et/ou paxilline dans le complexe d’adhésion focale, régulant ainsi le renouvellement du complexe. Gab1 sert à réguler l’activation de multiples protéines à la membrane incluant PI 3K, PLCγ, Crk et SHP2.

aminoterminal d’homologie à la pleckstrine (domaine PH), à PI<sub>3,4,5</sub>P<sub>3</sub> à la membrane [50]. La perte de l’activation de Gab1 par le récepteur c-met ou la perte de sa localisation membranaire élimine l’action tubulogénique de c-met.

Sos est le facteur d’échange nucléotidique de la guanine pour ras et son recrutement à la membrane par grb2 permet la conversion de GDPras en GTPras, permettant ainsi le début de l’activation de la voie MPAK (*mitogen activated protein kinase*). GTPras s’associe et active la sérine/thréonine kinase raf, qui à son tour, phosphoryle et active MEK qui alors phosphoryle en aval les sérine/thréonine kinase ERK. L’activation d’ERK entraîne sa translocation nucléaire et la régulation de facteurs de transcription impliqués dans la prolifération tels que ELK-1. Cependant, en screenant les protéines qui interagissent avec Gab1, nous avons

trouvé que ERK s'associe aussi avec Gab1 phosphorylé à la membrane cellulaire [51]. Cette phosphorylation survient dans le domaine de liaison à met de Gab1 près du site de liaison à PI 3K et paraît réguler l'association c-met/Gab1 avec PI 3K [52, 53]. L'observation que ERK recrute à la membrane après stimulation par HGF en conjonction avec les résultats de Finchman et coll. qui ont démontré que l'expression de v-src entraînait la localisation de ERK dans les complexes d'adhésion focale à la surface cellulaire [54], nous a conduit à examiner la possibilité qu'en addition de ses effets sur la signalisation par PI 3K, ERK jouait un rôle dans la régulation des sites d'interaction cellules-matrices après stimulation par HGF.

### HGF STIMULE L'INTERACTION PAXILLINE/FAK DE MANIÈRE ERK DÉPENDANTE

Pour commencer à déterminer l'importance de l'activation de ERK dans la séquence des événements morphologiques en réponse HGF, nous avons examiné les effets de l'inhibition de MEK sur les événements initiaux d'adhésion cellulaire (0-30 minutes) et d'étalement (30 minutes) ainsi que les réponses plus tardives incluant la migration et la tubulogénèse (4 à 7 jours). Dans chaque cas, l'inhibition de ERK, en utilisant les inhibiteurs de MEK U0126 ou PD98059, diminuait singulièrement l'effet de HGF sur la morphologie cellulaire sans avoir d'effet sur la viabilité cellulaire [18, 55]. De façon intéressante, cette importance centrale de l'activation de ERK dans l'étalement cellulaire et la migration apparaît assez spécifique des changements de morphologie induits par des facteurs de croissance puisque U0126 prévient à la fois la migration cellulaire et la tubulogénèse induite par HGF [55] et par EGF mais n'inhibe pas la migration cellulaire et la ramification induite par la polycystine 1 [35].

L'examen du complexe d'adhésion focale a montré qu'à la fois FAK et paxilline étaient phosphorylés sur des résidus de tyrosine en réponse à l'HGF et que la paxilline montrait une migration différente sur gel d'électrophorèse après stimulation par HGF [56]. La mobilité réduite sur l'électrophorèse est typique des protéines phosphorylées sur des sites sérine/thréonine tels que les motifs de phosphorylation de ERK, P-x-S/T-P. En effet, l'inhibition de MEK abolit complètement le retard de migration de la paxilline après stimulation par HGF. De plus, ERK activé s'associe avec paxilline de manière HGF-dépendante et ERK phosphoryle la paxilline à la fois *in vitro* et dans la cellule intacte.

L'examen de la séquence en acide aminé de la paxilline révèle plusieurs sites de phosphorylation potentiels par ERK, SP83, SP230 et SP288, sites qui sont contenus dans l'extrémité aminoterminal de la protéine dont deux flanquent les domaines LD responsables de l'association à FAK. La proximité de ces sites de phosphorylation par ERK et des domaines LD nous a conduit à l'hypothèse que la phosphorylation de paxilline par ERK puisse réguler l'association de paxilline et de FAK. Cette possibilité a été confirmée quand nous avons trouvé que l'interaction basale entre FAK et paxilline était fortement augmentée après stimulation par HGF et que cette augmentation était inhibée par le traitement des cellules par le U0126. Pour déterminer si la phosphorylation de paxilline par ERK médiait directement cet effet, la paxilline exprimée *in vitro* dans des bactéries a été phosphorylée avec ERK active avant de réaliser des essais d'immuno-

précipitation à partir de lysats cellulaires de cellules IMCD3, montrant une multiplication par 5 de l'association de FAK avec la paxilline préalablement phosphorylée par ERK.

Le recrutement de FAK aux complexes d'adhésion a été montré comme résultant de son activation et de sa phosphorylation sur des résidus de tyrosine. Pour déterminer si la phosphorylation de FAK induite par HGF et son activation dépendaient de l'association FAK-paxilline médiée par ERK, la phosphorylation de FAK a été examinée dans les cellules stimulées par EGF tout en inhibant MEK. Ces expériences ont révélé que HGF entraînait une augmentation de la phosphorylation de FAK qui était fortement diminuée si l'on bloquait l'activation de ERK. Ainsi, l'activation de ERK par HGF entraîne une association de ERK avec paxilline et une phosphorylation de paxilline ERK-dépendante, médiant ainsi le recrutement et l'activation de FAK.

## UN MODÈLE POUR LA SIGNALISATION PAR HGF DANS LA MORPHOGENÈSE ÉPITHÉLIALE

Ces résultats indiquent un rôle primordial de l'HGF conduisant à la formation des processus cellulaires et à un changement général de morphologie de la cellule qui, d'arrondie devient allongée, avec de nombreux prolongements cellulaires. Ce changement de morphologie cellulaire facilite l'étalement cellulaire, la migration cellulaire et le contact avec les cellules adjacentes, événement qui joue un rôle critique à la fois dans le développement du tubule à partir du mésenchyme métanéphrique et également dans la réparation tubulaire après nécrose cellulaire. Les événements cellulaires précoces qui conduisent à ces changements de morphologie sont résumés dans la figure 4.

Une cellule épithéliale quiescente en suspension dans la matrice ou reposant au sein d'un épithélium tubulaire) exprime à sa surface des intégrines médiant l'interaction avec la matrice environnante et la stabilisation d'une forme cellulaire arrondie (ou cuboïdale dans le cadre d'un tubule mature) due à la formation de filaments d'actine prenant origine dans le complexe d'adhésion focale par l'intermédiaire de protéines associées à la paxilline telles que l'actopaxine et la vinculine. L'activation du récepteur c-met stimule l'association et l'activation de PI 3K et de PLC ainsi qu'il a été décrit plus haut, résultant en une augmentation de calcium intracellulaire et au recrutement et à l'activation des PKC à la membrane. Ces événements conduisent à la déstabilisation des filaments d'actine existant et à la polymérisation de nouveaux filaments d'actine conduisant à l'extension de nouveaux prolongements cellulaires par l'activation de protéines telles que MARCKS et rac. De concert, l'activation locale de la voie des MAPK conduit à l'association sélective de ERK avec paxilline dans les complexes d'adhésion focale à proximité du récepteur activé. La phosphorylation de paxilline par ERK stimule le recrutement de FAK à ses points d'adhésion focale, conduisant à leur renouvellement et facilitant la formation de nouveaux complexes d'adhésion au niveau des extensions cellulaires. Par contact avec des extensions cellulaires provenant de cellules situées à proximité, ces changements précoces de morphologie d'une seule cellule procurent ainsi un modèle pour la formation d'une structure allongée tubulaire plutôt qu'une structure sphérique kystique.

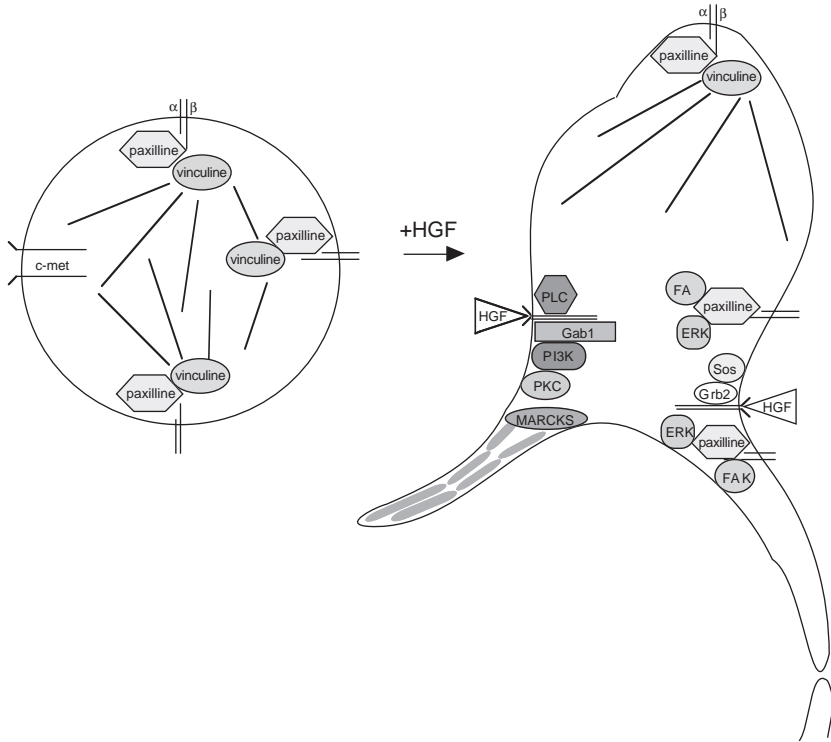


FIG. 4. — Modèle schématique représentant la morphogénèse épithéliale induite par le facteur de croissance HGF.

## Remerciements

Nous remercions très vivement le Professeur Bertrand Knebelmann qui a bien voulu se charger de la traduction de ce texte.

## BIBLIOGRAPHIE

1. SAKURAI H, BUSH KT, NIGAM SK. Identification of pleiotrophin as a mesenchymal factor involved in ureteric bud branching morphogenesis. *Development*, 2001, **128**, 3283-3293.
2. SAKURAI HT, TSUKAMOTO T, KJELSBORG CA et al. EGF receptor ligands are a large fraction of in vitro branching morphogens secreted by embryonic kidney. *Am J Physiol*, 1997, **273**, F463-F472.
3. SANTOS OF, BARROS EJ, YANG X-M et al. Involvement of hepatocyte growth factor in kidney development. *Dev Biol*, 1994, **163**, 525-529.
4. VAN ADELBERG J, SEHGAL S, KUKES A et al. Activation of hepatocyte growth factor (HGF) by endogenous HGF activator is required for metanephric kidney morphogenesis in vitro. *J Biol Chem*, 2001, **276**, 15099-15106.

5. BARASCH J, YANG J, QIAO J et al. Tissue inhibitor of metalloproteinase-2 stimulates mesenchymal growth and regulates epithelial branching during morphogenesis of the rat metanephros. *J Clin Invest*, 1999, **103**, 1299-1307.
6. GRISARU S, CANO-GAUCI D, TEE J et al. Glypican-3 Modulates BMP- and FGF-Mediated Effects during Renal Branching Morphogenesis. *Dev Biol*, 2001, **231**, 31-46.
7. KARIHALOO A, KARUMANCHI SA, BARASCH J et al. Endostatin regulates branching morphogenesis of renal epithelial cells and ureteric bud. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, **98**, 12509-12514.
8. BARASCH J, YANG J, WARE CB et al. Mesenchymal to epithelial conversion in rat metanephros is induced by LIF. *Cell*, 1999, **99**, 377-386.
9. ESSON ML, SCHRIER RW. Diagnosis and treatment of acute tubular necrosis. *Ann Intern Med*, 2002, **137**, 744-752.
10. HUMES HD, CIESLINSKI DA, COIMBRA TM et al. Epidermal growth factor enhances renal tubule cell regeneration and repair and accelerates the recovery of renal function in posts ischemic acute renal failure. *J Clin Invest*, 1989, **84**, 1757-1761.
11. JOANNIDIS M, SPOKES K, NAKAMURA T et al. Regional expression of hepatocyte growth factor/c-met in experimental renal hypertrophy and hyperplasia. *Am J Physiol*, 1994, **267**, F231-F236.
12. KAWAIDA K, MATSUMOTO K, SHIMAZU H et al. Hepatocyte growth factor prevents acute renal failure and accelerates renal regeneration in mice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, **91**, 4357-4361.
13. GRAZIANI A, GRAMAGLIA D, CANTLEY LC et al. The tyrosine-phosphorylated hepatocyte growth factor/scatter factor receptor associates with phosphatidylinositol 3-kinase. *J Biol Chem*, 1991, **266**, 22087-22090.
14. LIN JJ, CYBULSKY AV, GOODYER PR et al. Insulin-like growth factor-1 enhances epidermal growth factor receptor activation and renal tubular cell regeneration in posts ischemic acute renal failure. *J Lab Clin Med*, 1995, **125**, 724-733.
15. MILLER SB, MARTIN DR, KISSANE J et al. Insulin-like growth factor I accelerates recovery from ischemic acute tubular necrosis in the rat. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, **89**, 11876-11880.
16. HIRSCHBERG R, KOPPLE J, LIPSETT P et al. Multicenter clinical trial of recombinant human insulin-like growth factor I in patients with acute renal failure. *Kidney Int*, 1999, **55**, 2423-2432.
17. THADHANI R, PASCUAL M, BONVENTRE JV. Acute renal failure. *N Engl J Med*, 1996, **334**, 1448-1460.
18. MONTESANO R, MATSUMOTO K, NAKAMURA T et al. Identification of a fibroblast-derived epithelial morphogen as hepatocyte growth factor. *Cell*, 1991, **67**, 901-908.
19. LIU ZX, NICKEL CH, CANTLEY LG. HGF promotes adhesion of ATP-depleted renal tubular epithelial cells in a MAPK-dependent manner. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2001, **281**, F62-F70.
20. NAKAMURA T, NISHIZAWA T, HAGIYA M et al. Molecular cloning and expression of human hepatocyte growth factor. *Nature*, 1989, **342**, 440-443.
21. SONNENBERG E, MEYER D, WEIDNER KM et al. Scatter factor/hepatocyte growth factor and its receptor, the c-met tyrosine kinase, can mediate a signal exchange between mesenchyme and epithelia during mouse development. *J Cell Biol*, 1993, **123**, 223-235.
22. RAPRAEGER A, GUIMOND CS, KRUFKA A et al. Regulation by heparan sulfate in fibroblast growth factor signaling. *Methods Enzymol*, 1994, **245**, 219-240.
23. ZIONCHECK TF, RICHARDSON L, LIU J et al. Sulfated oligosaccharides promote hepatocyte growth factor association and govern its mitogenic activity. *J Biol Chem*, 1995, **270**, 16871-16878.
24. CANTLEY LG. Growth factors and the kidney : regulation of epithelial cell movement and morphogenesis. *Am J Physiol*, 1996, **271**, F1103-F1113.
25. COMOGLIO PM, BOCCACCIO C. The HGF receptor family : unconventional signal transducers for invasive cell growth. *Genes Cells*, 1996, **1**, 347-354.
26. WEIDNER KM, DI CESARE S, SACHS M et al. Interaction between Gab1 and the c-Met receptor tyrosine kinase is responsible for epithelial morphogenesis. *Nature*, 1996, **384**, 173-176.
27. DERMAN MP, CHEN JY, SPOKES KC et al. An 11-amino acid sequence from c-met initiates epithelial chemotaxis via phosphatidylinositol 3-kinase and phospholipase C. *J Biol Chem*, 1996, **271**, 4251-4255.
28. CANTLEY LG, CANTLEY LC. Signal transduction by the hepatocyte growth factor receptor, c-met : activation of the phosphatidylinositol 3-kinase. *J Am Soc Nephrol*, 1995, **5**, 1872-1881.

29. PONZETTO C, BARDELLI A, ZHEN Z et al. A multifunctional docking site mediates signaling and transformation by the hepatocyte growth factor/scatter factor receptor family. *Cell*, 1994, **77**, 261-271.
30. DERMAN M, CUNHA MJ, BARROS EJ et al. HGF-mediated chemotaxis and tubulogenesis require activation of the phosphatidylinositol 3-kinase. *Am J Physiol*, 1995, **268**, F1211-F1217.
31. DERMAN MP, TOKER V, HARTWIG JH et al. The lipid products of phosphoinositide 3-kinase increase cell motility through protein kinase C. *J Biol Chem*, 1997, **272**, 6465-6470.
32. ARBUZOVA A, SCHMITZ AA, VERGERES G. Cross-talk unfolded : MARCKS proteins. *Biochem J*, 2002, **362**, 1-12.
33. TOKER A, MEYER M, REDDY KK et al. Activation of protein kinase C family members by the novel polyphosphoinositides PtdIns-3,4-P2 and PtdIns-3,4,5-P3. *J Biol Chem*, 1994, **269**, 32358-32367.
34. BAE YS, CANTLEY LG, CHEN CS et al. Activation of phospholipase C-gamma by phosphatidylinositol 3,4,5- trisphosphate. *J Biol Chem*, 1998, **273**, 4465-4469.
35. RAMEH LE, RHEE SG, SPOKES K et al. Phosphoinositide 3-kinase regulates phospholipase Cgamma-mediated calcium signaling. *J Biol Chem*, 1998, **273**, 23750-23757.
36. NICKEL C, BENZING T, SELLIN L et al. The polycystin-1 C-terminal fragment triggers branching morphogenesis and migration of tubular kidney epithelial cells. *J Clin Invest*, 2002, **109**, 481-489.
37. SANTOS OF, NIGAM SK. HGF-induced tubulogenesis and branching of epithelial cells is modulated by extracellular matrix and TGF-beta. *Dev Biol*, 1993, **160**, 293-302.
38. GUMBINER BM. Cell adhesion : the molecular basis of tissue architecture and morphogenesis. *Cell*, 1996, **84**, 345-357.
39. BEVIGLIA L, KRAMER RH. HGF induces FAK activation and integrin-mediated adhesion in MTLn3 breast carcinoma cells. *Int J Cancer*, 1999, **83**, 640-649.
40. TRUSOLINO L, CAVASSA S, ANGELINI P et al. HGF/scatter factor selectively promotes cell invasion by increasing integrin avidity. *Faseb J*, 2000, **14**, 1629-1640.
41. HAGEL M, GEORGE EL, KIM A et al. The adaptor protein paxillin is essential for normal development in the mouse and is a critical transducer of fibronectin signaling. *Mol Cell Biol*, 2002, **22**, 901-915.
42. ILIC D, FURUTA Y, KANAZAWA S et al. Reduced cell motility and enhanced focal adhesion contact formation in cells from FAK-deficient mice. *Nature*, 1995, **377**, 539-544.
43. BURRIDGE K, TURNER CE, ROMER LH. Tyrosine phosphorylation of paxillin and pp125FAK accompanies cell adhesion to extracellular matrix : a role in cytoskeletal assembly. *J Cell Biol*, 1992, **119**, 893-903.
44. PARR C, DAVIES G, NAKAMURA T et al. The HGF/SF-induced phosphorylation of paxillin, matrix adhesion, and invasion of prostate cancer cells were suppressed by NK4, an HGF/SF variant. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001, **285**, 1330-1337.
45. TURNER CE. Paxillin. *Int J Biochem Cell Biol*, 1998, **30**, 955-959.
46. TURNER CE, BROWN MC, PERROTTA JA et al. Paxillin LD4 motif binds PAK and PIX through a novel 95-kD ankyrin repeat, ARF-GAP protein : A role in cytoskeletal remodeling. *J Cell Biol*, 1999, **145**, 851-863.
47. PARSONS JT, MARTIN KH, SLACK JK et al. Focal adhesion kinase : a regulator of focal adhesion dynamics and cell movement. *Oncogene*, 2000, **19**, 5606-5613.
48. NEBE B, SANFTLEBEN H, POMMERENKE H et al. Hepatocyte growth factor enables enhanced integrin-cytoskeleton linkage by affecting integrin expression in subconfluent epithelial cells. *Exp Cell Res*, 1998, **243**, 263-273.
49. LAI JF, KAO SC, JIANG ST et al. Involvement of focal adhesion kinase in hepatocyte growth factor-induced scatter of Madin-Darby canine kidney cells. *J Biol Chem*, 2000, **275**, 7474-7480.
50. FURGE KA, ZHANG YW, VANDE WOUDE GF. Met receptor tyrosine kinase : enhanced signaling through adapter proteins. *Oncogene*, 2000, **19**, 5582-5589.
51. ROSHAN B, KJELSBERG C, SPOKES K et al. Activated ERK2 interacts with and phosphorylates the docking protein GAB1. *J Biol Chem*, 1999, **274**, 36362-36368.
52. YU CF, LIU ZX, CANTLEY LG. ERK negatively regulates the epidermal growth factor-mediated interaction of Gab1 and the phosphatidylinositol 3-kinase. *J Biol Chem*, 2002, **277**, 19382-19388.
53. YU CF, ROSHAN B, LIU ZX et al. ERK regulates the hepatocyte growth factor-mediated interaction of Gab1 and the phosphatidylinositol 3-kinase. *J Biol Chem*, 2001, **276**, 32552-32558.

- 
54. FINCHAM VJ, JAMES M, FRAME MC et al. Active ERK/MAP kinase is targeted to newly forming cell-matrix adhesions by integrin engagement and v-Src. *Embo J*, 2000, **19**, 2911-2923.
  55. KARIHALOO, A, O'ROURKE DA, NICKEL C et al. Differential MAPK pathways utilized for HGF- and EGF-dependent renal epithelial morphogenesis. *J Biol Chem*, 2001, **276**, 9166-9173.
  56. LIU ZX, YU CF, NICKEL C et al. Hepatocyte growth factor (HGF) induces ERK-dependent paxillin phosphorylation and regulates paxillin/FAK association. *J Biol Chem*, 2002, **277**, 10452-10458.