

N° d'ordre : 3244

# THÈSE

Présentée à

**L'UNIVERSITÉ BORDEAUX I**

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES DU VIVANT, GÉOSCIENCES ET  
SCIENCES DE L'ENVIRONNEMENT

Par M Gueric ANIES

POUR OBTENIR LE GRADE DE

**DOCTEUR**

SPÉCIALITÉ : Sciences des Aliments et Nutrition

\*\*\*\*\*

Etude d'une nouvelle voie d'activation de la protéine kinase Akt,  
Rôle de la PhosphoInositide 3-Kinase.

\*\*\*\*\*

Présentée et soutenue publiquement le 23 novembre 2006

Devant le jury d'examen composé de :

Dr Paul Higueret, Professeur de l'Université de Bordeaux 1  
Dr Georges Bismuth, Directeur de Recherche  
Dr Jacques Nunes, Chargé de recherche  
Dr IJsbrand KRAMER, Professeur de l'Université de Bordeaux 1

Président  
Rapporteur  
Rapporteur  
Directeur de Thèse



*A mes parents,*

*A Aymeric,*

*A toute ma famille et mes amis*

*A Nathalie.*



Par ces quelques lignes, je tiens à remercier toutes les personnes qui m'ont accompagné tout au long de ces trois années de thèse.

Je tiens tout d'abord à remercier le Professeur HIGUERET d'avoir accepté de présider mon jury, mes rapporteurs M BISMUTH et M NUNES d'avoir accepté de juger mon travail de thèse.

Mes remerciements s'adressent à l'ensemble des membres du laboratoire avec lesquels j'ai passé ces trois années de thèse. Merci Catherine, Edith, Violaine et Viviane ; Merci aux anciens thésards Benjamin, Caroline, Christine et Florence ; Merci aux anciens masters devenus de jeunes thésards Anne, Fabien et Patricia, et enfin, Merci Nanou.

Je voudrais aussi remercier les différentes personnes des équipes voisines à la notre ; Merci aux membres de l'équipe « Lang » et Merci aux membres de l'équipe « Ichas ».

MERCI aux membres du KWAI ; Merci Cécile, Fred, Margo et Thomas

MERCI au bureau de la rédaction ; Merci Florence, Loïc, Peter et Thomas.

J'aimerais aussi remercier tous les biologistes, chimistes, RMNistes, et autres « istes » (présents ou passés) du bâtiment que j'ai côtoyé lors des pauses café ou lors des apéros IECBiens.

Enfin, je tiens à remercier l'ensemble de l'institut, les personnes de l'accueil, de l'administration, de la maintenance et de l'entretien.

Bref MERCI MERCI et MERCI A TOUS !!!!



## **Table des matières**

<b>A. Introduction Bibliographique</b>	<b>1</b>
1. L'anoïkis	2
a) Définition de l'apoptose	2
b) Les structures et les molécules d'adhérence	4
(1) Aperçu des molécules d'adhérence	5
(2) Les complexes focaux	6
(3) Les contacts focaux	6
(4) Les structures fibrillaires d'adhérence	7
(5) Les podosomes	7
(6) L'adhérence lors de la diapédèse des lymphocytes	9
c) Rôles et mécanismes de l'anoïkis :	10
(1) Rôle dans l'homéostasie tissulaire	10
(2) Rôle dans l'oncogenèse, pathologies diverses	10
(3) Mécanismes mis en jeu lors de l'anoïkis	10
2. La PI3K	15
a) Les Phosphoinositides kinases	15
b) Les membres de la famille des Phosphoinositides 3 kinases	16
(1) Les PhosphoInositides 3 kinases de classe I	16
(2) Les PhosphoInositides 3 kinases de classe II	17
(3) Les PhosphoInositides 3 kinases de classe III	17
c) Définition et structure de la PI3K de classe Ia	19
(1) Sous-unité catalytique P110	19
(2) Sous-unité régulatrice P85	19
(3) Les inhibiteurs des PI3K	26
(4) Activation des PI3K de classe Ia et leurs fonctions	27
3. La famille des Rho GTPases et la protéine Rac	31
a) Les GTPases monomériques - définitions	31
b) Régulation des GTPases monomériques.	32
(1) Les GEFs : Guanine Nucleotide Exchange Factors.	32
(2) Les GAPs : GTPase Activating Proteins.	32
(3) GDIs : GTP Dissociation Inhibitors.	33
c) La famille des Rho GTPases	34
d) La protéine Rac	34
(1) Régulation de Rac par sa localisation.	35
(2) Rac – Cytosquelette – Adhérence.	36
(3) Rac et Survie cellulaire	37
(4) Mutants de Rac et Cdc42.	37
(5) Rac et la PI3K de classe Ia	38
4. La protéine Akt (PKB)	39
a) Définition	39
b) Rôle et Structure	40
c) Régulation de l'activité de la protéine Akt	40
(1) Régulation PI3K dépendante	40
(2) Voie PI3K indépendante	42
(3) Les protéines qui se lient et régulent Akt	42
d) Régulation de la survie cellulaire par la protéine kinase Akt	43
(1) BAD	43
(2) Caspase-9	43
(3) FoxO Forkhead	44
(4) NF-kB	44
(5) JNK	44
(6) Mdm2	44
(7) CREB	44
e) Akt et Adhérence	45
f) PI3K, Rac et Akt	45
<b>B. Introduction du sujet</b>	<b>47</b>

**C. Matériel et Méthodes----- - 49 -**

1. Matériel biologique -----	49 -
a) Souches bactériennes-----	49 -
b) Lignées cellulaires -----	49 -
2. Matériel-----	49 -
a) Plasmides-----	49 -
b) Anticorps-----	50 -
c) Produits chimiques-----	51 -
3. Méthodes -----	52 -
a) Milieux et conditions de cultures -----	52 -
b) Techniques de biologie moléculaire-----	53 -
c) Transfections-----	61 -
d) Techniques biochimiques -----	62 -
e) Techniques d'imagerie -----	67 -

**D. Résultats – Discussion----- - 69 -**

1. Première Partie : L'activité de la protéine kinase Akt est contrôlée par la GTPase Rac et la phosphatase SHIP en conditions non adhérentes. -----	69 -
a) Introduction du papier -----	69 -
b) "The GTPase Rac and the phosphatase SHIP control Akt activity under non adherent conditions"-----	70 -
c) Discussion du papier-----	107 -
2. Deuxième Partie : Etude de la voie « R-P-A »-----	111 -
a) Cellules A20 modèle d'étude de la voie « R-P-A ».-----	112 -
b) Analyse des niveaux d'expression des composants de la voie « R-P-A » en fonction de l'état d'adhérence dans le modèle A20. -----	113 -
(1) Niveau d'expression et Etat d'activation de Rac en fonction de l'état d'adhérence des cellules.-----	113 -
(2) Expression des isoformes P85 $\alpha$ et P85 $\beta$ dans le modèle A20.-----	114 -
(3) Etude des phosphatases dans les cellules A20 -----	116 -
c) Régulation de la PI3K au sein de la voie « R-P-A » -----	117 -
(1) Rac activateur de la PI3K ?-----	117 -
(a) Etude de l'interaction P85-Rac-----	117 -
(b) Le domaine BH, domaine responsable de l'interaction P85-Rac. -----	119 -
(c) Rac régule-t-il la phosphorylation de P85 $\alpha$ ?-----	121 -
d) Conclusions sur l'étude de la régulation de la voie « R-P-A ».-----	122 -
e) Conclusions générales sur la voie « R-P-A »-----	125 -
3. Troisième Partie : « Formation des podosomes sous le contrôle de la GTPase Cdc42 dans des cellules endothéliales. » -----	127 -
a) Introduction du papier -----	127 -
b) « Cdc42-driven podosome formation in endothelial cells »-----	128 -
4. Quatrième partie : La PI3K et son rôle dans l'adhérence cellulaire, fonction des podosomes. - 135 -	
(1) Etude du rôle de la PI3K dans la formation et la fonction des podosomes-----	136 -
(a) Localisation de la PI3K au niveau des podosomes -----	136 -
(b) La PI3K est nécessaire à la formation des podosomes-----	141 -
(c) Mécanismes d'action de la PI3K lors de la formation des podosomes.-----	143 -
(2) Discussion sur le rôle de la PI3K dans la formation des podosomes.-----	146 -
5. Cinquième Partie : PI3K, étude d'un nouveau mécanisme de régulation.-----	149 -
a) Gels non dénaturants-----	150 -
(1) Les domaines BH isolés forment des homodimères-----	150 -
(2) Test de dimérisation sur protéine entière -----	153 -
b) Spectrométrie de Masse -----	154 -
c) Conclusions sur l'étude de la dimérisation de P85 -----	157 -

Table des matières

<b>E. Conclusion Générale</b>	<b>159</b>
1. Caractérisation de la voie d'activation d'Akt par Rac	159
2. La PI3K régule la formation des podosomes	164
<b>Bibliographie</b>	<b>167</b>
<b>Annexes</b>	<b>179</b>



**Abréviations**

BH	Bcr Homology
CAM	Cell Adhesion Molecules
CTMP	Carboxyl-Terminal Modulator Protein
ERK	Extracellular Regulated Kinase
FAK	Focal Adhesion Kinase
FITC	Fluorescein Iso ThyoCyanate
GAP	GTPase Activating Protein
GEF	Guanine Nucleotide Exchange Factor
GDI	GTP Dissociation Inhibitor.
GDP	Guanosine Diphosphate
GST	Gluthatione-S-Transferase
GTP	Guanosine Triphosphate
IF	Immunofluorescence
ILK	Integrin Linked Kinase
IPTG	IsoPropyl-beta-D-ThioGalactopyranoside
JNK	c-Jun NH2-terminal Kinase
LB	Luria Broth
MEC	Matrice ExtraCellulaire
MMPs	Matrix Metalloproteins
NF-kB	Nuclear Factor kB
PAE	Porcin Aortic Endothelial
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
PDK1	Phosphoinositide-Dependent protein Kinase-1
PH	Pleckstrin Homology
PI3K	PhosphoInositide 3-kinase
PIP3	PhosphatdylInositol (3,4,5)P3
PKA	Protein Kinase A
PKB	Protein Kinase B
PKC	Protein Kinase C
PTEN	Phosphatase and TENsin homolog deleted on chromosome-10
Ptdins	Phosphatidylinositol
R-P-A	Rac-PI3K-Akt
SH2	Src Homology Domain 2
SH3	Src Homology Domain 3
TCR	T Cell Antigen Receptor
TB	Terrific Broth
TCL1	T-cell leukemia/lymphoma)
WB	Western-Blot



**Liste des figures et tableaux :**

Figure 1 Schémas descriptifs de l'apoptose et de la nécrose.	- 3 -
Figure 2 Structure des podosomes.	- 8 -
Figure 3 Altérations du cytosquelette impliquées dans l'anoïkis.	- 13 -
Figure 4 Synthèse des PhosphoInositides.	- 15 -
Figure 5 Sous-unité catalytique P110.	- 19 -
Figure 6 Aperçu schématique des différentes sous-unités régulatrices de la PI3K de classe Ia.	- 20 -
Figure 7 Description de P85, sous-unité régulatrice de la PI3K de classe Ia.	- 20 -
Figure 8 Domaine BH de P85 alpha.	- 23 -
Figure 9 Alignement de séquence des sous-unités régulatrice P85α.	- 25 -
Figure 10 Récapitulatif des fonctions liées à P85.	- 30 -
Figure 11 Schéma d'activation des petites GTPases.	- 32 -
Figure 12 Arbre phylogénique des protéines de la famille Rho-GAP.	- 33 -
Figure 13 Arbre phylogénique des Rho-GTPases.	- 34 -
Figure 14 La localisation de Rac et son interaction avec ses effecteurs est régulée par les intégrines.	- 36 -
Figure 15 Différentes voies régulées par Akt.	- 39 -
Figure 16 Représentation schématique de la protéine kinase Akt.	- 40 -
Figure 17 Schéma d'activation de la protéine kinase Akt.	- 41 -
Figure 18 Récapitulatif des constructions utilisées pour cette étude.	- 50 -
Figure 19 : Schéma descriptif de la technique adoptée pour réaliser le mutant de délétion :P85βΔBH.	- 55 -
Figure 20 : Schéma décrivant la première étape de réalisation du mutant P85βΔBH	- 56 -
Figure 21 Correction de la mutation A1674T de l'ADNc de P85β.	- 58 -
Figure 22: Construction du plasmide HA.	- 61 -
Figure 23 Expression des protéines de fusion étiquetées avec la GST.	- 65 -
Figure 24 Analyse du niveau d'expression de P85α et P85β et de P110α dans les lignées DT40 wt et DT40 SHIP-/-.	- 108 -
Figure 25 L61Rac active Akt dans les cellules A20 Non Adhérentes.	- 112 -
Figure 26 Niveau d'expression et état d'activation de Rac en fonction de l'état d'adhérence des cellules A20	- 113 -
Figure 27 Expression des sous-unités régulatrices de la PI3K, P85α et P85β, dans les cellules A20.	- 115 -
Figure 28 Analyse de l'expression des phosphatases PTEN et SHIP dans les cellules A20.	- 116 -
Figure 29 Précipitation de la sous-unité P85 et ses mutants par GST pull-down.	- 118 -
Figure 30 Le domaine BH de P85α interagit avec Rac.	- 119 -
Figure 31 Le domaine BH de P85β n'interagit pas avec Rac.	- 120 -
Figure 32 Analyse comparative de l'association de Rac avec le domaine BH de P85α et de P85β.	- 120 -
Figure 33 Rac induit la phosphorylation de P85α.	- 121 -
Figure 34 Localisation de la sous-unité P110α aux podosomes dans le modèle PAEV12Cdc42.	- 137 -
Figure 35 Localisation des sous-unités P85 aux podosomes dans le modèle PAEV12Cdc42.	- 137 -
Figure 36 Localisation de la sous-unité P85α aux podosomes dans le modèle PAEV12Cdc42.	- 139 -
Figure 37 La sous-unité P85β n'est pas localisée aux podosomes dans le modèle PAEV12Cdc42.	- 139 -
Figure 38 Recrutement des formes exogènes HA-P85α et HA-P85β aux podosomes V12cdc42.	- 140 -
Figure 39 L'inhibiteur des PI3K, Ly294002, empêche la formation des podosomes.	- 142 -
Figure 40 Effet des domaines BH isolés sur la formation des podosomes.	- 144 -
Figure 41 Recrutement des formes exogènes HA-P85ΔBHα et HA-P85ΔBHβ aux podosomes V12cdc42.	- 145 -
Figure 42 GELS NON DENATURANTS.	- 151 -
Figure 43 GELS NON DENATURANTS. Western-Blot.	- 152 -
Figure 44 Le domaine BHα est capable de s'homodimériser.	- 155 -
Figure 45 Le domaine BHβ est capable de s'homodimériser.	- 156 -
Figure 46 Séquence de P85α murine.	- 179 -
Figure 47 Séquence de P85β murine.	- 180 -
Tableau 1 Conditions des transfections par électroporation en fonction des différents types cellulaires.	- 62 -
Tableau 2 Récapitulatif des constructions « P85 » obtenues lors de ce travail.	- 181 -



## **A. Introduction Bibliographique**

*Le mot « cancer » vient du mot grec « karkinos » qui signifie « crabe » ou « pince », ce mot utilisé depuis l'antiquité a réellement trouvé son sens avec l'avènement de la biologie moléculaire dans les années 1970. C'est à cette époque que l'on a commencé à comprendre les mécanismes à l'origine de la transformation d'une cellule normale en cellule cancéreuse, avec la découverte des « gènes du cancer ».*

*Chez une personne saine, le nombre de cellules et leur spécialisation est contrôlé par l'organisme. Chez les personnes atteintes d'un cancer, les cellules cancéreuses échappent à tout contrôle, se multiplient de façon anarchique et perdent leur spécificité. Souvent, elles migrent vers d'autres tissus de l'organisme où elles continuent de croître, on parle alors de métastases.*

*Les cancers ont pour origine une accumulation d'anomalies génétiques au sein d'une cellule. Leurs causes sont multiples : hérédité, environnement, virus, vieillissement, etc...*

*Toutes les cellules de l'organisme subissent un contrôle strict visant à éliminer les cellules non conformes. Ce contrôle, une fois enclenché, va induire un programme de mort cellulaire, autrement dit apoptose, conduisant à l'élimination de la cellule « défectueuse ».*

*Dans ce chapitre d'introduction, je présente l'anoïkis qui constitue le thème d'étude du sujet ainsi que les trois protéines principales que sont la PI3K, la protéine Akt et la GTPase Rac.*

## **1. L'anoïkis**

Anoïkis : mot d'origine Grecque signifiant « sans abri », qui définit un type particulier d'apoptose induit suite à la perte des contacts de la cellule avec la matrice extracellulaire ou suite à la perte des contacts cellule-cellule. L'anoïkis est un mécanisme indispensable au bon fonctionnement d'un organisme et ce type d'apoptose est présent dans pratiquement tous les types cellulaires testés.

Les structures d'adhérence jouent un rôle clef dans le maintien de la survie conféré par l'adhérence cellulaire et on peut noter l'importance toute particulière des protéines membranaires que sont les intégrines. Les structures d'adhérence peuvent être assimilées, dans ce cas, à de véritables senseurs de l'état d'adhérence des cellules et lors d'un détachement anormal d'une cellule, la perte de signalisation par ces structures va transmettre l'ordre à la cellule d'entrer en apoptose. On parle alors d'anoïkis.

Après une brève définition de l'apoptose, un aperçu des structures d'adhérence et des molécules qui les composent, je vais m'attarder sur les acteurs et les mécanismes mis en jeu lors du phénomène d'anoïkis.

### **a) Définition de l'apoptose**

La cellule peut enclencher deux processus par lesquels elle va cesser de « vivre » : la nécrose considérée comme une mort cellulaire « désordonnée » et l'apoptose considérée comme une mort cellulaire « organisée ».

Au cours de la nécrose, la cellule va se gorger d'eau au point qu'elle va exploser par rupture de sa membrane plasmique, les organelles vont également être dégradés, le noyau est quant à lui dégradé de façon anarchique par les endonucléases libérées. Cette lyse cellulaire va conduire au relargage, dans le milieu environnant, du contenu cytoplasmique qui va entraîner une réponse inflammatoire et affecter les tissus environnants.

En opposition à cette mort « désorganisée », le second moyen par lequel meurt une cellule est l'apoptose qui est un processus de mort cellulaire programmée. Les cellules endommagées, surnuméraires ou potentiellement dangereuses pour l'organisme, sont éliminées par apoptose. C'est pour cela que l'apoptose est considérée comme essentielle au développement et au maintien de l'intégrité tissulaire. Les conséquences de l'apoptose sur une cellule sont un rétrécissement cellulaire, une fragmentation en vacuoles, une condensation de la chromatine, une dégradation ciblée de l'ADN, un désassemblage d'organites cellulaires et une

Introduction bibliographique

fragmentation nucléaire. Apparaissent, suite à ces étapes, les corpuscules apoptotiques. L'élimination de la cellule apoptotique se concrétise par la phagocytose des corps apoptotiques.

Un schéma descriptif de l'apoptose et de la nécrose est représenté à la Figure 1.

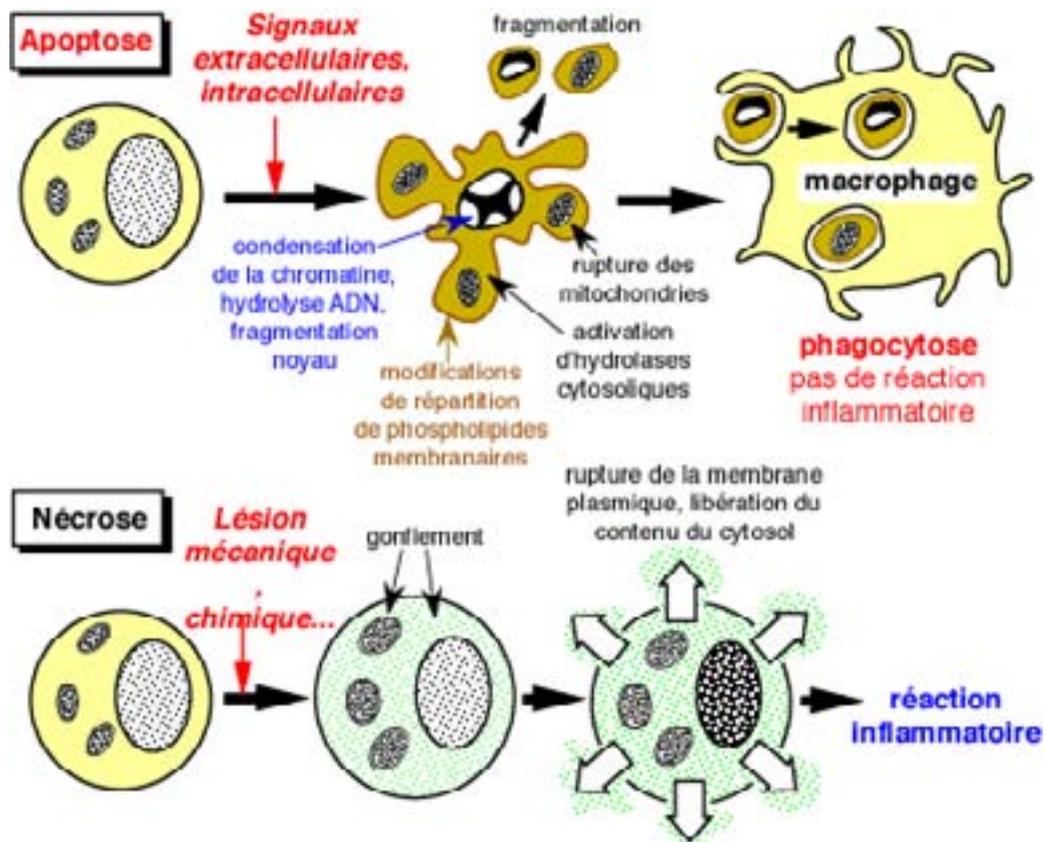


Figure 1 Schémas descriptifs de l'apoptose et de la nécrose.

**b) Les structures et les molécules d'adhérence**

Les sites d'adhérence d'une cellule avec la matrice extracellulaire (MEC) ont été décrits il y a maintenant près de 30 ans ; ces découvertes ont été réalisées par des études par microscopie électronique et des études par « interference-reflection Microscopy » (Abercrombie, Heaysman et al. 1971; Abercrombie and Dunn 1975; Izzard and Lochner 1976; Izzard and Lochner 1980). Ces études ont montré que l'adhérence des cellules à la matrice passe par plusieurs structures allongées de petite taille (quelques micromètres) présentes au niveau de la surface ventrale des cellules.

L'adhérence cellule-matrice extracellulaire joue un rôle important dans les processus biologiques que sont la motilité cellulaire, la prolifération, la différenciation, la régulation de l'expression de gènes et encore la survie cellulaire. Cette adhérence des cellules avec la matrice extracellulaire est assurée par un ensemble de structures spécialisées que sont les complexes focaux, les contacts focaux et encore les plaques fibrillaires d'adhérence. Dans ce chapitre, je vais m'intéresser aux différentes structures d'adhérence citées, à leurs composants structurels et aux mécanismes entraînant leur formation et leur régulation. De plus, je vais m'attarder sur le phénomène de diapédèse, phénomène où les lymphocytes développent des capacités à adhérer, aussi je décrirai de nouvelles structures, les podosomes, qui peuvent être assimilées à des structures d'adhérence.

Un point commun à toutes les structures d'adhérence est leur interaction avec le cytosquelette d'actine, aussi, les différentes structures peuvent être classifiées par la nature des complexes d'actine auxquelles elles sont associées. Une autre constante de ces structures est la présence d'intégrines, protéines couplant la matrice extracellulaire et le cytosquelette d'actine.

Les structures d'adhérence ne vont apparaître qu'après le premier contact entre la cellule et la matrice extracellulaire; ces contacts sont réalisés par tout un éventail de molécules dites d'adhérence. Ces molécules vont faire le contact, le stabiliser et enfin le maintenir. Parmi ces molécules, on trouve les intégrines, éléments essentiels de toutes les structures d'adhérence cellule-matrice extracellulaire, mais aussi d'autres molécules tels que les molécules de la superfamille des Immunoglobulines, les Sélectines ou encore les Cadhérines impliquées dans les structures d'adhérence cellule-cellule.

### **(1) Aperçu des molécules d'adhérence**

#### **(a) Les Intégrines**

Les intégrines sont les molécules majoritairement impliquées dans l'interaction avec la matrice extracellulaire, elles interagissent avec les composants de la matrice extracellulaire tels que le collagène, la laminine, ou encore la fibronectine. Les intégrines forment des hétérodimères composés par une sous-unité  $\alpha$  et une sous-unité  $\beta$ . A ce jour, on dénombre 18 sous-unités  $\alpha$  et 8 sous-unités  $\beta$  ce qui nous donne un grand nombre de combinaisons possibles. Chacun des hétérodimères va avoir une certaine spécificité pour un composant donné de la matrice, à titre d'exemples, l'intégrine  $\alpha_7\beta_1$  se lie préférentiellement à la laminine, l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$  va plutôt interagir avec la vitronectine ou la fibronectine quant à l'intégrine  $\alpha_5\beta_1$  elle s'associe de préférence à la fibronectine.

Comme le suggère son nom, l'intégrine, va permettre l'interaction entre la matrice extracellulaire et le cytosquelette d'actine. Après cette première interaction, les intégrines vont se regrouper au niveau de la membrane pour créer une première ébauche de structure d'adhérence.

Il faut remarquer que les intégrines ne sont pas seulement des molécules de pontage entre la MEC et le cytosquelette, mais constituent de véritables molécules de signalisation.

Je reviendrais par la suite sur cette fonction de signalisation et je développerais la signalisation associée au phénomène d'anoïkis (Frisch and Ruoslahti 1997; Giancotti and Ruoslahti 1999).

#### **(b) Les Cadhérines**

Les interactions cellule-cellule sont assurées essentiellement par les Cadhérines (Patel, Chen et al. 2003), ces molécules forment une superfamille de glycoprotéines transmembranaires. On va trouver différentes sous-familles : les N-Cadhérines, les E-Cadhérines, les P-Cadhérines,... toutes sont caractérisées en fonction de leur expression tissulaire spécifique. Tout comme les intégrines, les cadhérines assurent un contact et sont aussi des molécules de signalisation. Les cadhérines partagent certaines voies de signalisation avec les intégrines.

#### **(c) Les Sélectines**

Les sélectines sont composées dans leur partie extracellulaire d'un domaine qui se lie aux lectines (carbohydrates). Ce sont des molécules particulièrement importantes pour établir l'interaction entre les cellules lymphocytaires et les cellules endothéliales lors du phénomène de diapédèse. Il existe trois classes de sélectines : les L-sélectines importantes lors du

phénomène de « homing » (migration des leucocytes au travers de l'endothélium vasculaire vers leur tissu cible) ; les E-sélectines exprimées par les cellules endothéliales sont des récepteurs liant les leucocytes, ces sélectines jouent un rôle dans la médiation de la réponse inflammatoire ; et enfin les P-sélectines portées par les corps de Weibel-Palade endothéliaux et  $\alpha$ -granules plaquettaires (Ley 2001).

#### **(d) Superfamille des Immunoglobulines**

La superfamille des Immunoglobulines regroupe un ensemble de molécules d'adhérence dont la structure est très similaire à celle des immunoglobulines. Ce peut être des molécules de reconnaissance de l'antigène par les lymphocytes (CD3, CD4, CD8), ce sont également des molécules qui vont permettre l'interaction avec les cellules endothéliales. A titre d'exemple I-CAM-1 et I-CAM2 exprimées par les cellules endothéliales sont reconnues par les intégrines des leucocytes. Suivant leur localisation, on appelle ces molécules L-CAM (liver) pour les cellules hépatiques, N-CAM pour les cellules neurales, I-CAM pour les cellules inflammatoires et V-CAM pour les cellules vasculaires. (CAM: pour Cell Adhesion Molecules).

#### ***(2) Les complexes focaux***

Lorsque les cellules sont mises à adhérer sur une matrice, dans les minutes qui suivent, les complexes focaux apparaissent. Ces structures sont des complexes de petite taille (environ 1 $\mu$ m et ponctiforme), elles sont localisées au niveau du front de migration dans le lamellipode des cellules en migration ou à la périphérie des cellules stationnaires. Les complexes focaux sont associés aux processus migratoires et sont considérés comme les précurseurs des contacts focaux.

La régulation des structures d'adhérence est fortement liée à celle du cytosquelette d'actine. Il faut souligner l'importance des GTPases dans la formation de ces structures, en particulier Rac et Cdc42 concernant les complexes focaux (Nobes and Hall 1995; Rottner, Hall et al. 1999). Une forme constitutivement active de Rac entraîne la formation des complexes focaux.

#### ***(3) Les contacts focaux***

Les contacts focaux sont des structures plates et allongées, de forme ovoïde, mesurant quelques micromètres (2 à 5 $\mu$ m). Les contacts focaux sont localisés à proximité de la périphérie des cellules. Cette structure forme une véritable plateforme, constituée de différentes protéines, qui va permettre d'interconnecter de façon ferme le cytosquelette d'actine avec la matrice extracellulaire, cette structure est associée aux fibres de stress.

## Introduction bibliographique

La formation des contacts focaux résulte de la maturation des complexes focaux, cette transition ferait suite à un changement de l'équilibre de l'activité des GTPases de la famille Rho (Rac, Cdc42 et Rho) et suite à un changement dans l'état de contractilité des cellules (Rottner, Hall et al. 1999). L'état de contractilité est régulé par la petite GTPase Rho et par ses effecteurs ROCK et mDIA (Riveline, Zamir et al. 2001).

Les complexes focaux sont enrichis en intégrines mais aussi d'autres molécules de signalisation telles que des protéines tyrosine kinases (FAK), des sérine-thréonine kinases (PAK), des phosphatases (SHP-2). Ces structures sont décrites comme des mécanosenseurs (Bershadsky, Ballestrem et al. 2006), les complexes focaux seraient de véritables senseurs sondant leur environnement afin de réguler les processus dépendant de l'adhérence cellulaire.

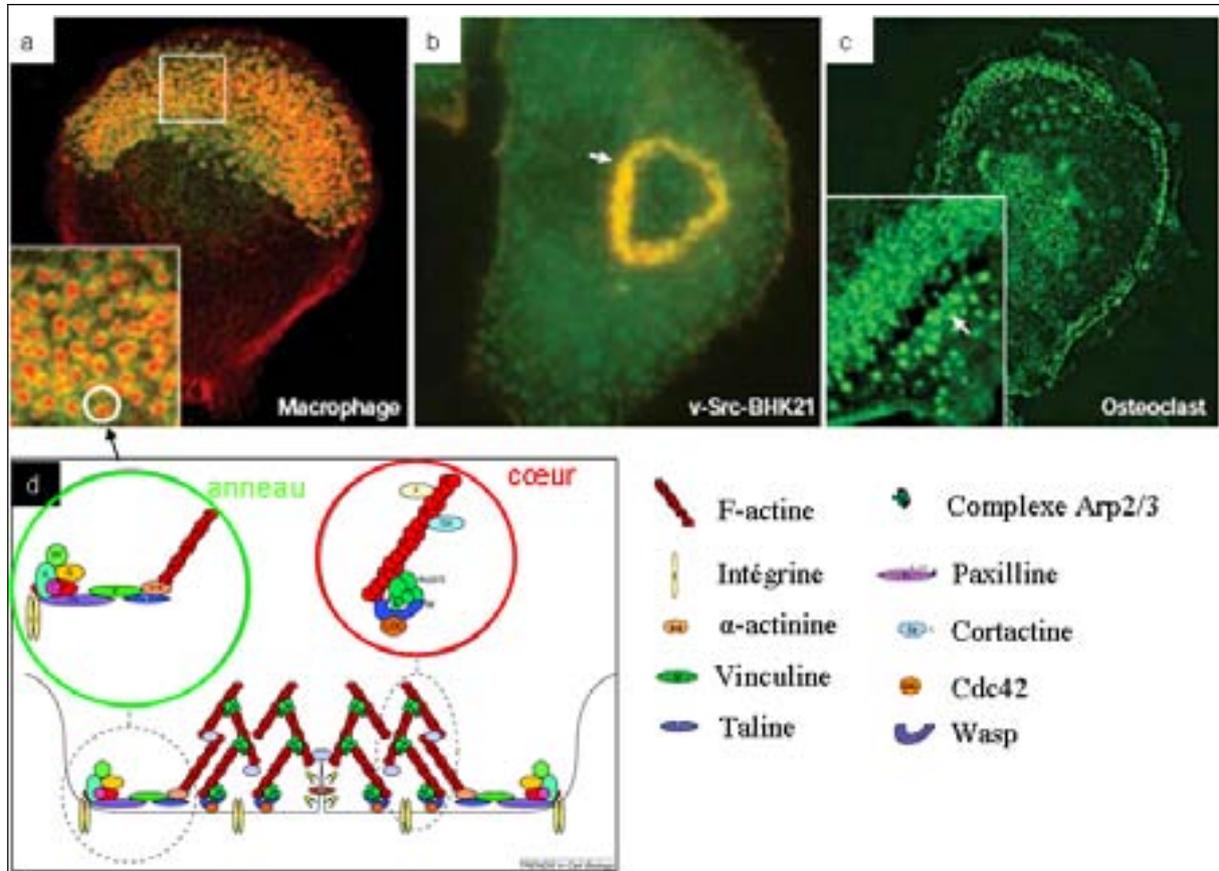
### ***(4) Les structures fibrillaires d'adhérence***

Les « structures fibrillaires d'adhérence » sont des structures réparties dans l'ensemble de la cellule toujours au niveau ventral, ces structures sont allongées et connectées à la fibronectine.

### ***(5) Les podosomes***

Les podosomes sont des structures qui ont été découvertes il y a 25 ans (David-Pfeuty and Singer 1980). Ils ne sont retrouvés que dans certains types cellulaires tels que les ostéoclastes (Marchisio, Cirillo et al. 1984; Moreau, Tatin et al. 2003), macrophages/monocytes, cellules dendritiques immatures, cellules musculaires lisses et cellules endothéliales (Marchisio, Cirillo et al. 1984; Moreau, Tatin et al. 2003). On peut également trouver des podosomes dans les fibroblastes transformés par une forme oncogénique de la kinase Src, ou dans des cellules tumorales invasives où ils sont souvent appelés invadopodes. Les podosomes sont constitués d'un cœur riche en actine polymérisée (actine-F) entouré d'un anneau de vinculine (voir Figure 2). Toujours présents sur la surface ventrale des cellules, ces structures ont un diamètre de 0,2 à 0,5  $\mu\text{m}$  et une épaisseur variant de 0,5 à 2  $\mu\text{m}$ , les podosomes peuvent être trouvés sous forme individuelle ou regroupés, on parle alors de rosettes de podosomes. Structurellement proches des contacts focaux, les podosomes sont néanmoins distinguables aisément par le cœur d'actine très spécifique de ces structures et par la présence de molécules comme la gelsoline, Arp2/3, N-Wasp, des MMPs, la dynamine et la cortactine qui sont absentes des contacts focaux. Comme dans les contacts focaux, nous allons retrouver des intégrines, des protéines de signalisation : Fak, Src, Pyk2 mais aussi des petites GTPases telles que RhoA ou Cdc42.

La présence d'intégrines et les contacts étroits avec la matrice extracellulaire évoque un rôle dans l'adhérence cellulaire ainsi que la migration, et celle des MMPs dans l'invasion et la dégradation de la matrice extracellulaire.



**Figure 2 Structure des podosomes.** (a) Podosomes de macrophages visualisés par un co-marquage fluorescent de la F-actine en rouge et de la vinculine en vert (b) Rosettes de podosomes marquée en rouge pour l'actin-F et en vert pour la dynamine-2. (c) Ceinture de podosomes dans les ostéoclastes, visualisée en vert par l'actine-F. (d) Modèle de l'organisation structurale d'un podosome individuel (coupe transversale). (Adapté d'après Linder et al 2003, et Buccione et al 2004)

Ces structures, complexes focaux, contacts focaux, plaques fibrillaires d'adhérence et podosomes sont des plateformes de signalisation. La formation de ces structures est liée à l'attachement de la cellule à un support (MEC), à la tension exercée par ce support (Bershadsky, Ballestrem et al. 2006) et à l'association avec le cytosquelette d'actine. Une modification de l'état d'adhérence induit la perte des interactions des molécules d'adhérence, une désorganisation du cytosquelette et les tensions exercées sur la cellule sont changées ; ces événements aboutissent à la perte des structures d'adhérence et de ce fait à la perte de la signalisation associée.

**(6) L'adhérence lors de la diapédèse des lymphocytes**

La diapédèse se déroule lors du processus inflammatoire, elle correspond à la transmigration des leucocytes au travers de l'endothélium. Les lymphocytes circulant vont lors de ce phénomène passer par un état adhérent. La première étape débute par une interaction des lymphocytes avec l'endothélium par l'intermédiaire des Sélectines ; s'ensuit une autre étape qui permet d'établir une adhésion forte, cette étape est dépendante des intégrines et de molécules de la superfamille des Immunoglobulines exprimées par les lymphocytes. Les intégrines impliquées sont diverses : « leukocyte fonction-associated antigen-1 » LFA-1,  $\alpha_1\beta_2$ , MAC-1 (ou  $\alpha_m\beta_2$ ) ces intégrines portées par les lymphocytes vont interagir avec des molécules de la superfamille des Immunoglobulines tels que JAM1, VE-JAM ou JAM2, ICAM-1,-2 et-3, VCAM, ... Parmi les les molécules de la superfamille des Immunoglobulines exprimées à la surface des lymphocytes on trouve par exemple JAM3 molécule de la famille JAM (Junctional Adhesion Molecule). L'expression et la localisation des molécules d'adhérence sont les facteurs qui régulent l'adhérence.

**c) Rôles et mécanismes de l'anoïkis :**

***(1) Rôle dans l'homéostasie tissulaire***

L'anoïkis est une « forme » d'apoptose qui tient un rôle important dans le développement et le maintien de l'homéostasie tissulaire chez un organisme. Par exemple, lors de l'embryogenèse chez les vertébrés, la perte de contact avec la matrice extracellulaire des cellules de l'endoderme va permettre l'étape de cavitation (Coucouvanis and Martin 1995).

D'autres exemples de régulation de l'homéostasie tissulaire impliquant l'anoïkis peuvent être cités ; l'anoïkis serait importante pour la formation de l'épiderme (Tamada, Takama et al. 1994), aussi lors de l'involution des glandes mammaires (Li, Liu et al. 1997).

***(2) Rôle dans l'oncogenèse, pathologies diverses***

Dans la recherche en oncologie, l'étude du processus métastatique est d'une importance cruciale, en effet, la dissémination métastatique est considérée comme l'événement létal dans la majorité des cancers. Les cellules cancéreuses métastatiques circulant dans l'organisme ne sont plus dépendantes d'un ancrage à la matrice extracellulaire car elles sont devenues résistantes à l'anoïkis (Ruoslahti and Reed 1994). L'acquisition d'une résistance à l'anoïkis est une étape critique dans la transformation métastatique d'une tumeur. La dérégulation d'oncogènes tels que Rac, Src, Ras ou encore Akt ou de suppresseurs de tumeur PTEN, P53 pour ne citer que ceux-là, rend les cellules résistantes à l'anoïkis (Khwaja, Rodriguez-Viciano et al. 1997; Nikiforov, Kwek et al. 1997; Coniglio, Jou et al. 2001).

D'autres pathologies peuvent être liées au phénomène d'anoïkis. Dans certaines maladies de peau, tels que le pemphigus vulgaire (bulles à l'intérieur de l'épiderme), les kératinocytes entrent en apoptose, par anoïkis, suite à la perte des contacts cellule-cellule (Gniadecki, Jemec et al. 1998).

***(3) Mécanismes mis en jeu lors de l'anoïkis***

Les intégrines sont les premières molécules qui distribuent des signaux de vie s'il y a une bonne adhérence cellulaire mais dans les phénomènes d'anoïkis beaucoup d'autres voies peuvent être affectées. La cellule dispose avec une multitude de senseurs pour la renseigner sur son état d'adhérence, ces senseurs peuvent être les molécules d'adhérence directement liées à la matrice extracellulaire ou bien les molécules impliquées dans la liaison cellule-cellule ou encore les senseurs peuvent être au niveau de la structure du cytosquelette d'actine (complexes focaux, contacts focaux, podosomes).

## Introduction bibliographique

Une modification de la forme de la cellule par modification du cytosquelette ou bien par une modification des forces contractiles exercée sur elle, peut entraîner une signalisation qui va aboutir à l'activation du programme de mort cellulaire, par ailleurs une perte des contacts cellule-MEC ou cellule-cellule peut également aboutir à l'activation de l'apoptose. Tous ces mécanismes sont intimement liés car il est facile d'imaginer que si une cellule perd ses contacts cellulaires cela conduit à une modification de la forme de la cellule par changement de structure du cytosquelette et aussi une modification des forces contractiles exercée par l'environnement.

Pour l'anoïkis il est donc impossible de décrire une voie spécifique responsable de l'induction de l'apoptose, je vais résumer les événements et cascades de signalisation qui peuvent être activés après un détachement anormal d'une cellule, sans vraiment pouvoir relier ces cascades à un événement particulier : pertes des structures d'adhérences, modification du cytosquelette ou modifications des forces contractiles.

### **(a) Rôle des intégrines :**

Parmi cette grande famille des intégrines, quelles sont celles qui sont effectivement nécessaires à la transmission des signaux de survie cellulaire ? Beaucoup d'études ont été menées sur ce sujet et il apparaît qu'il n'y a pas une seule intégrine impliquée dans la survie mais plusieurs.

Les intégrines envoient des signaux de survie, le détachement de la cellule de son support va perturber la distribution de cette signalisation de « survie ». La signalisation par les intégrines implique de très nombreuses molécules, on retrouve ainsi des kinases associées aux intégrines tels que les protéines FAK (pour Focal Adhesion-Kinase) ou ILK (pour Integrin-Linked Kinase). Quand l'intégrine est engagée dans une liaison avec la matrice, la protéine FAK va venir s'associer à l'intégrine, s'ensuit alors son activation par phosphorylation, puis le recrutement d'autres protéines de signalisation. La signalisation induite par la protéine FAK conduit à l'inhibition de l'apoptose (Hungerford, Compton et al. 1996; Xu, Owens et al. 1996) et cette signalisation se fait par l'intermédiaire de différentes voies. Par exemple, dans des fibroblastes (Xia, Nho et al. 2004), suite à l'interaction intégrine-MEC, la protéine FAK est activée induisant en réponse l'activation de la PI3K via son interaction avec la sous-unité P85 (Chen and Guan 1994) et de la protéine Akt ; la conséquence de l'activation de cette voie est une protection vis-à-vis de l'apoptose. FAK permet également d'activer la voie ERK (Schlaepfer and Hunter 1997) mais aussi la voie JNK (Almeida, Ilic et al. 2000) ; FAK permet ainsi la propagation de signaux anti-apoptotique (Manohar, Shome et al. 2004)

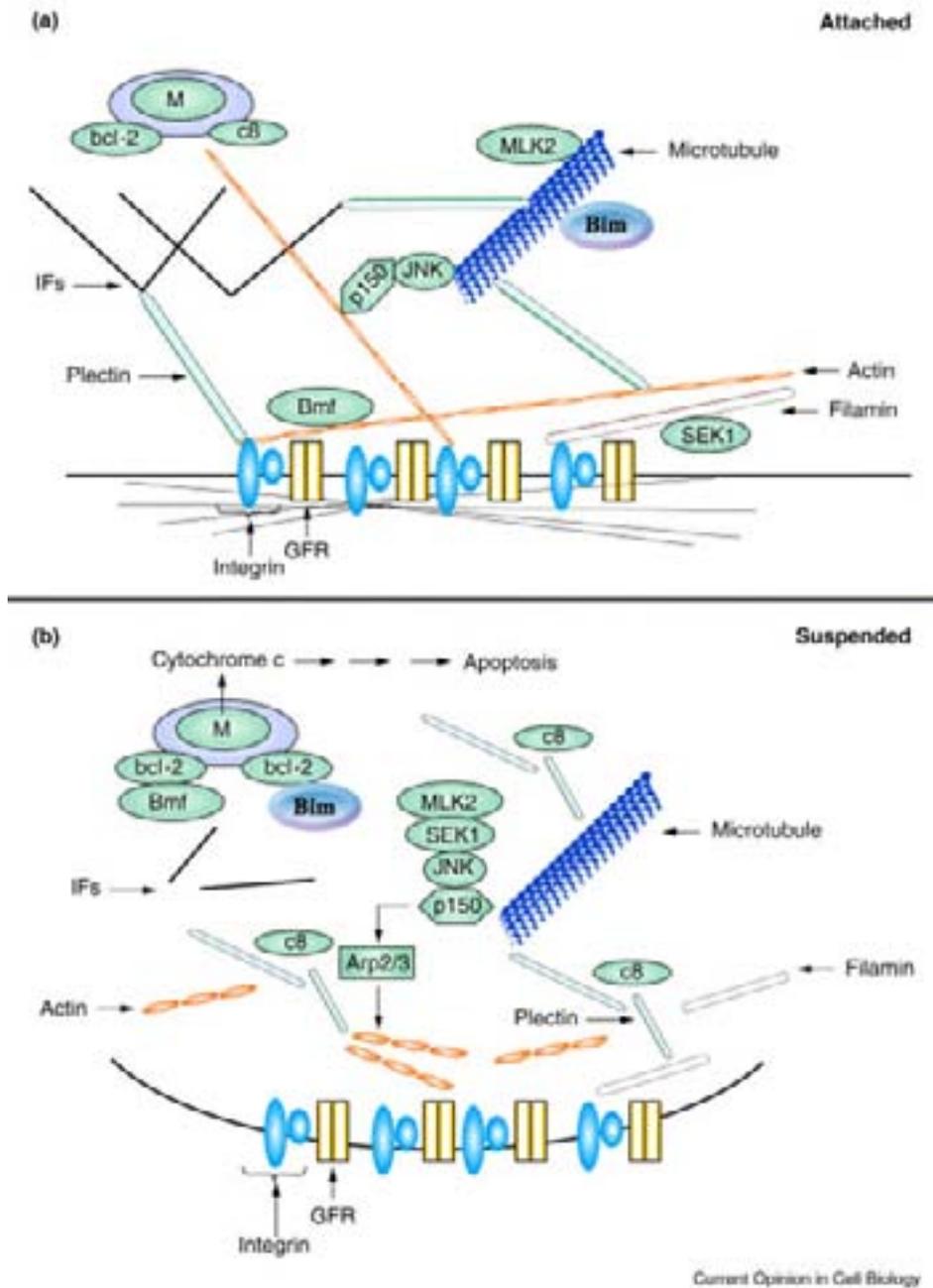
## Introduction bibliographique

Il apparait que la protéine Akt est capitale dans les mécanismes de survie cellulaire puisque beaucoup de signaux convergent vers cette protéine. Le rôle de la protéine Akt dans les mécanismes de survie sera davantage documenté dans le chapitre destiné à la description de la protéine Akt.

Une autre voie de signalisation des intégrines indépendante de FAK et d'ILK est proposée, elle est dépendante de la protéine adaptatrice Shc et permet d'activer la voie ERK.

### **(b) Rôle du cytosquelette :**

Si l'on compare le cytosquelette d'une cellule adhérente à celui d'une cellule en suspension on observe de profonds changements structurels. De nombreuses molécules impliquées dans la régulation de la survie cellulaire, activatrice ou inhibitrice de l'apoptose, sont liées au cytosquelette d'actine ou aux microtubules (voir Figure 3). Une désorganisation du cytosquelette va permettre la perte d'interaction de ces molécules. Ces molécules, lorsqu'elles sont activatrices de l'apoptose, vont entraîner une signalisation conduisant à l'anoïkis. Il existe des connections entre la voie JNK et le cytosquelette, une déstructuration du cytosquelette entraîne une activation de la voie JNK qui a alors un effet pro-apoptotique. Un autre exemple est celui de la protéine Bmf qui est associée au cytosquelette d'actine, après détachement des cellules de leur support, le cytosquelette d'actine est désorganisé et Bmf est relarguée dans le cytosol où elle va interagir avec Bcl-2 et l'inhiber et donc stimuler l'apoptose (Puthalakath, Villunger et al. 2001). Il existe un lien également avec le réseau de microtubules. La protéine Bim s'associe à ce réseau ; la déstructuration des microtubules induit par un détachement anormal des cellules à leur support induit le relarguage de Bim dans le cytosol où cette dernière va induire la libération du cytochrome C par les mitochondries et le processus apoptotique (Tong, Ji et al. 2005).



**Figure 3 Altérations du cytosquelette impliquées dans l'anoïkis.** En (a) sont représentées des cellules adhérentes et (b) des cellules en suspension. L'altération du cytosquelette va entraîner la libération de certaines molécules qui jusqu'alors étaient séquestrées par le cytosquelette ou par les microtubules. Ainsi Bmf et Bim libérée de leur interaction avec respectivement le cytosquelette d'actine et les microtubules vont permettre in fine la libération du cytochrome c et de ce fait enclencher le processus apoptotique (Adapté d'après (Frisch and Screaton 2001)).

**(c) Rôle des GTPases et Akt**

Les Rho GTPases ont été montrées comme étant des acteurs dans la transformation tumorale tout comme la protéine Akt. Rac et Cdc42 sont impliquées dans le phénomène d'anoïkis, la surexpression d'une forme active de Rac permet de sauver des cellules épithéliales de l'anoïkis par l'activation des voies NF $\kappa$ B, ERK et Akt (Coniglio, Jou et al. 2001). De même, la surexpression de formes mutées à caractère dominant négatif des protéines Rac et Cdc42 mime la perte d'adhérence (Zugasti, Rul et al. 2001), cette voie fait intervenir la protéine Akt. Les GTPases Rac et Cdc42 en amont d'Akt activeraient cette dernière via la synthèse de PIP3 suite à l'activation de la PI3K. L'activation de la PI3K par ces GTPases a été montrée in-vitro (Zheng, Bagrodia et al. 1994; Tolia, Cantley et al. 1995), cette activation reste à démontrer in-vivo. Aussi nous ne connaissons toujours pas le mécanisme par lequel la PI3K est activée par ces GTPases.

## 2. La PI3K

### a) Les Phosphoinositides kinases

Les phosphoinositides kinases forment une classe d'enzymes permettant l'ajout d'un groupement phosphate sur les phosphoinositides. Les membres de cette famille de protéines sont classés en fonction de la position, sur le cœur inositol, sur laquelle sera ajouté le groupement phosphate. Le cœur inositol peut être phosphorylé sur les positions 3' ; 4' et 5' ; Au départ, l'étude des phosphoinositides s'est concentrée sur la conversion du phosphatidylinositol-4,5-biphosphate (PtdIns(4,5) P<sub>2</sub>) en diacylglycerol (DAG) et en inositol-1,4,5-triphosphate (IP<sub>3</sub>) ; réaction catalysée par la phospholipase C (PLC), elle va conduire in-fine à l'activation de la Protéine Kinase C (PKC). Quelques années plus tard, des chercheurs ont montrés que les PtdIns(4,5) P<sub>2</sub> pouvaient être phosphorylés en position 3' par une PhosphoInositide 3-Kinase pour former dans ce cas un PtdIns(3,4,5) P<sub>3</sub> ou PIP3 (voir Figure 4).

Les rôles physiologiques des phosphoinositides sont variés. Considérés comme des second messagers, ils vont intervenir dans de multiples processus cellulaires.

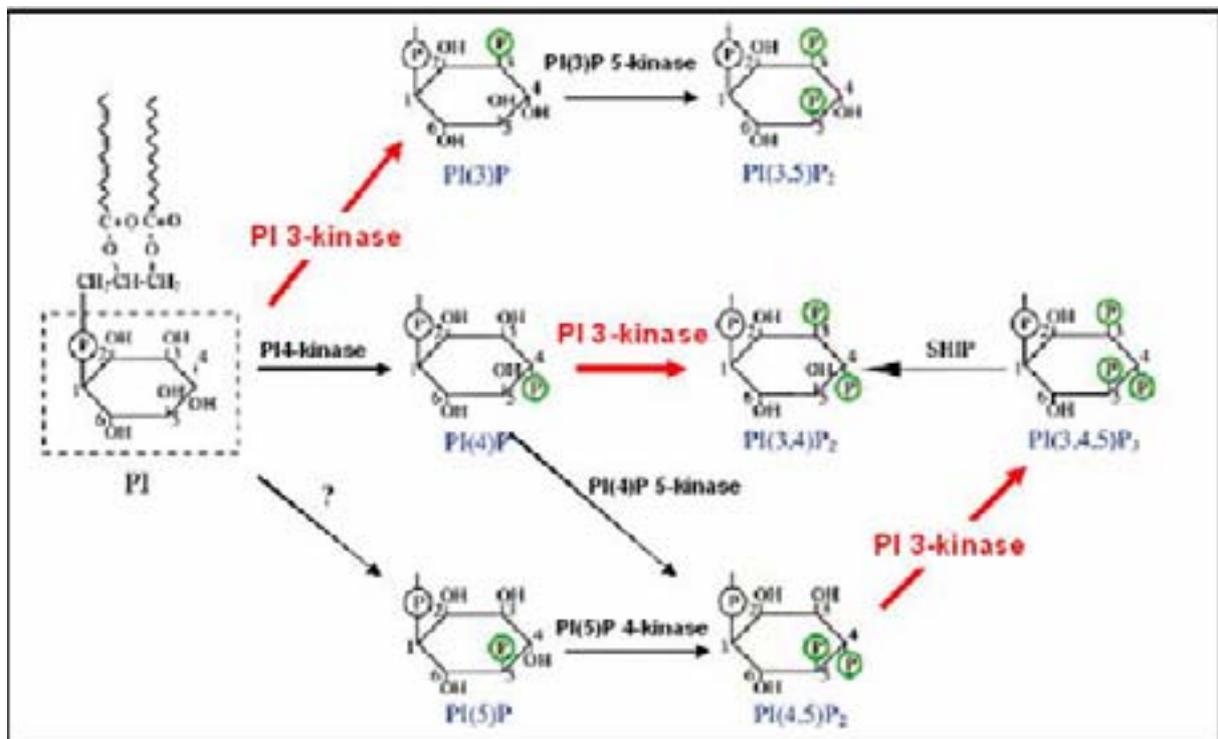


Figure 4 Synthèse des PhosphoInositides. Adapté d'après (Kanaho and Suzuki 2002).

**b) Les membres de la famille des Phosphoinositides 3 kinases**

Une activité Phosphatidylinositol kinase a été découverte il y a près de 20 ans, en 1984 (Sugimoto, Whitman et al. 1984). Elle a été trouvée associée à des oncogènes tel que Src (Sugimoto, Whitman et al. 1984), Abl, ou à l'antigène moyen T (mT) des virus de polyome (Whitman, Kaplan et al. 1985; Fukui, Kornbluth et al. 1989). Aussi, cette activité a été mise en évidence dans des complexes comprenant les récepteurs de facteurs de croissance, tel que le PDGF (Kaplan, Whitman et al. 1987; Auger, Serunian et al. 1989). C'est en 1988 (Whitman, Downes et al. 1988) qu'on a montré que cette activité Phosphatidylinositol kinase permettait la phosphorylation en position 3'OH d'où le nom qu'on l'on connaît aujourd'hui : Phosphoinositide 3 kinase ou « PI3K ».

Cette activité a été retrouvée dans l'ensemble des cellules eucaryotes. L'activité de la PI3K est impliquée dans de très nombreux processus cellulaires notamment la régulation de la survie cellulaire, l'entrée dans un cycle cellulaire, la prolifération, la croissance cellulaire et encore le trafic vésiculaire.

De nombreux dérèglements de l'activité PI3K sont sources de pathologies (Wymann and Marone 2005), c'est le cas de certaines allergies (Wymann, Bjorklof et al. 2003), de maladies cardiaques (Oudit, Sun et al. 2004) ou encore dans certains types de cancers (Samuels and Ericson 2006). La PI3K est impliquée dans la signalisation de l'insuline, un dérèglement de l'activité de la PI3K est la cause de nombreux diabètes de type2 (Hansen, Andersen et al. 1997; Barroso, Luan et al. 2003).

Il existe 8 différentes sous-unités catalytiques qui ont conduit à créer 3 groupes distincts. Ces 3 groupes ont été créés sur la base des homologies de séquence, de spécificité de substrats et de l'association différentielle avec des sous-unités régulatrices. Ces différentes classes sont présentées par la suite.

***(1) Les PhosphoInositides 3 kinases de classe I***

Cette classe de PI3K est composée de quatre sous-unités catalytiques: P110 $\alpha$ , P110 $\beta$ , P110 $\delta$  et P110 $\gamma$ . Structurellement très proches, ces quatre protéines ont aussi une spécificité identique pour les substrats, elles vont induire la phosphorylation en position 3'OH sur les PtdIns, PtdIns(4)P<sub>1</sub> et enfin le substrat préférentiel, le PtdIns(4,5) P<sub>2</sub>.

Les PI3Ks de classe I sont plutôt cytosoliques, elles deviennent majoritairement membranaires suite à un stimulus.

## Introduction bibliographique

Leur action va s'effectuer principalement au niveau de la membrane plasmique mais elle peut également être trouvée au niveau des vésicules membranaires ou encore au niveau de la membrane nucléaire.

Cette classe est subdivisée en deux sous-classes : classe Ia et classe Ib. La classification a été élaborée en fonction des partenaires de régulation et en fonction des mécanismes d'activation.

### **(a) Classe Ia**

Classe composée de 3 sous-unités régulatrices : P110 $\alpha$ , P110 $\beta$  et P110 $\delta$ . Ces protéines vont interagir avec une sous-unité régulatrice P85.

### **(b) Classe Ib**

Cette classe ne dénombre qu'une seule sous-unité catalytique P110  $\gamma$  associée à une sous-unité régulatrice P101. L'activation de cette classe passe par les protéines G hétérotrimériques. Cette classe de molécules joue un rôle important dans des processus tels que les allergies, l'inflammation ou encore la contraction cardiaque.

## ***(2) Les PhosphoInositides 3 kinases de classe II***

Il existe trois représentants de cette classe chez l'homme et chez les mammifères en général. Chez l'homme on trouve les trois gènes: PI3KC2 $\alpha$ , PI3KC2 $\beta$  et PI3KC2 $\gamma$ .

Les membres de cette classe sont quasi-exclusivement retrouvés associés aux membranes qu'elles soient plasmiques, vésiculaires ou encore nucléaires.

Cette classe est certainement la moins bien caractérisée. Les substrats préférentiels, in vitro, sont le PtdIns(4) et le PtdIns. Ces enzymes répondent à différents stimuli que sont : la signalisation via les intégrines, les facteurs de croissance, les chémokines. Le mécanisme d'activation n'est pas bien connu, il dépend de plusieurs événements comme la phosphorylation sur des tyrosines ou un recrutement de protéines adaptatrices (Grb2, clathrine).

Un point remarquable est l'absence de sous-unité régulatrice, la régulation de l'activité serait alors assurée par les domaines présents aux extrémités carboxy-terminale et amino-terminale, ces domaines seraient impliqués dans des interactions avec des lipides et ou protéines.

## ***(3) Les PhosphoInositides 3 kinases de classe III***

Le représentant le plus connu de cette classe est certainement Vps34, protéine de levure dont chaque eucaryote en possède un homologue. Les molécules de cette classe III permettent la phosphorylation des Phosphatidylinositol (Ptdins). Vps34 est associée à une sous-unité régulatrice d'environ 150 Kda : VPS15 chez la levure ou PIK3R4 chez l'homme. La sous-

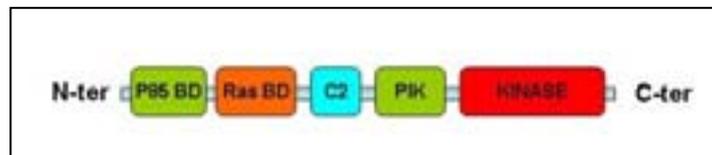
### Introduction bibliographique

unité régulatrice possède une activité protéine sérine kinase intrinsèque indispensable à l'activité de Vps34. Les fonctions de cette classe de molécules concernent le trafic vésiculaire. Ainsi, il a été montré que Vps34 permet la fusion des endosomes. Elle serait aussi impliquée dans l'autophagie, la formation des phagosomes et le transport vers la membrane nucléaire.

### c) Définition et structure de la PI3K de classe Ia

#### (1) Sous-unité catalytique P110

Les sous-unités catalytiques P110 $\alpha$  et P110 $\beta$  sont exprimées dans tous les types cellulaires au contraire de la sous-unité P110 $\delta$  qui est préférentiellement exprimée dans les cellules hématopoïétiques. Structuellement ces trois protéines sont très proches. Les trois isoformes P110 contiennent depuis leur extrémité amino-terminale un domaine de liaison à P85 suivi d'un site d'interaction avec Ras (sous sa forme GTP). On trouve ensuite un domaine C2 liant les phospholipides (de façon calcium dépendante), une région « PIK homology » (région conservée dans la famille PI3K et PI4K et chez d'autres protéines telles que DNA-PK, mTor ou ATM). Enfin, le domaine catalytique est trouvé en position carboxy-terminale.

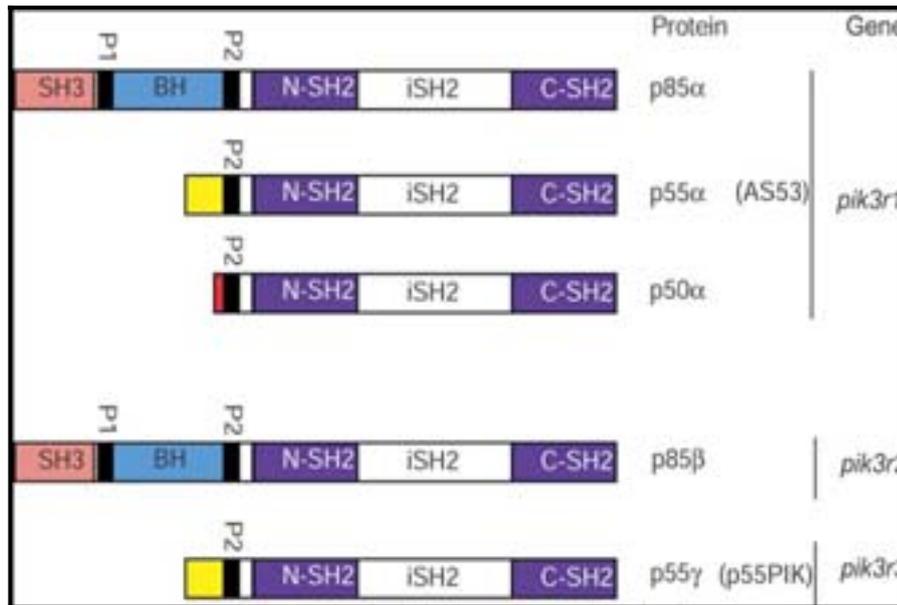


**Figure 5** Sous-unité catalytique P110. P85 BD : domaine de liaison à P85, Ras BD : domaine de liaison à Ras, domaine C2, domaine PIK, Kinase : domaine à activité catalytique.

#### (2) Sous-unité régulatrice P85

Il est fréquent de trouver le terme « P85 » utilisé comme raccourci pour nommer les sous-unités régulatrices de la PI3K de classe Ia. Dans ce manuscrit, dans la partie résultats, on trouvera donc le terme P85, mais ce dernier n'impliquera vraiment que les deux isoformes P85 $\alpha$  et P85 $\beta$ .

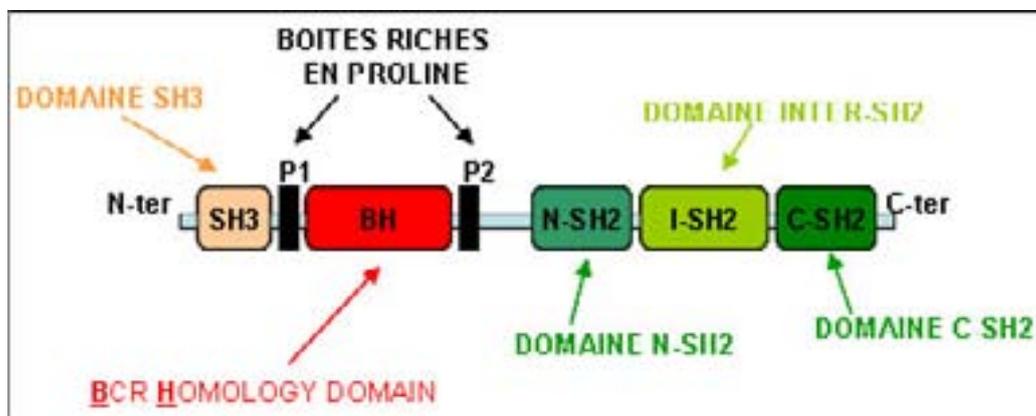
On dénombre 5 isoformes de la sous-unité régulatrice de la PI3K : P85 $\alpha$ , P50 $\alpha$ , P55 $\alpha$ , P85 $\beta$  et P55 $\gamma$ . Le gène PIK3R1 code pour les trois variants d'épissage : P85 $\alpha$ , P50 $\alpha$  et P55 $\alpha$ , le gène PIK3R2 code pour l'isoforme P85 $\beta$  et enfin le troisième gène PIK3R3 code pour l'isoforme P55 $\gamma$  (voir Figure 6). Structuellement très proches, ces 5 isoformes partagent un certain nombre de domaines protéiques. Cependant, il est intéressant de remarquer que chez la mouche *Drosophila melanogaster* ou bien chez le ver *Caenorhabditis elegans* on ne trouve qu'une seule isoforme de la sous-unité régulatrice et cette isoforme est structuellement proche des isoformes P50 $\alpha$  et P55, ceci laisse suggérer que les isoformes P85  $\alpha$  et  $\beta$  seraient apparus à un stade d'évolution plus tardif et rempliraient donc de nouvelles fonctions.



**Figure 6** Aperçu schématique des différentes sous-unités régulatrices de la PI3K de classe Ia. P1 et P2 signifie boîte riche en proline, iSH2 pour inter-SH2, N-SH2 pour SH2 NH2-terminal, C-SH2 pour SH2 COOH-terminal, BH pour Bcr Homology. P55α et P50 α ont respectivement en position NH2-terminale 34 (boîte jaune) et 6 acides aminés (boîte rouge). La boîte NH2 terminale de P55γ est similaire à celle de P55α. Figure tirée d'article (Okkenhaug and Vanhaesebroeck 2001).

**(a) Structures des isoformes P85α et P85β**

La sous-unité régulatrice est composée de multiples domaines, ainsi on trouve en position amino-terminale un domaine SH3 (Src Homology domain 3) suivi de deux boîtes riches en prolines P1 et P2 entourant un domaine nommé BH pour BCR Homology (BCR pour Breakpoint Cluster Region), enfin, du côté carboxy terminal on trouve deux domaines SH2 (Src Homology domain 2) qui ceignent le domaine inter-SH2 (i-SH2) (voir Figure 7).



**Figure 7** Description de P85, sous-unité régulatrice de la PI3K de classe Ia.

- **Domaine SH3 :**

Le domaine SH3 n'est présent que dans les isoformes les plus longs : P85 $\alpha$  et P85 $\beta$ . Les domaines SH3 sont en général impliqués dans des interactions avec d'autres protéines et ont une affinité particulière pour les motifs protéiques riches en proline. Le domaine SH3 a été montré interagir avec de nombreuses protéines tels que Crk, Ruk, Dynamine, CMS, p130CAS, synapsin (Harpur, Layton et al. 1999; Kirsch, Georgescu et al. 1999; Gout, Middleton et al. 2000; Li, Stupack et al. 2000; Onofri, Giovedi et al. 2000; Gelkop, Babichev et al. 2001; Harrison-Findik, Misra et al. 2001; Ren, Bolton et al. 2005; Ren, Xue et al. 2005) ; ces interactions joueraient sur la régulation de la PI3K.

- **Boîtes riches en proline P1 et P2 :**

Les sous-unités régulatrices contiennent toutes une boîte riche en prolines (P2), quant aux isoformes P85 $\alpha$  et P85 $\beta$  elles ont une boîte riche en prolines (P1) supplémentaire. Ces motifs riches en proline ont une affinité pour les domaines SH3, ils permettraient des interactions protéiques. De plus, il a été suggéré que la boîte P1 d'une molécule de P85 $\alpha$  permettrait d'établir une homodimérisation via son association avec le domaine SH3 d'une autre molécule de P85 $\alpha$  (Harpur, Layton et al. 1999).

Au sein de l'isoforme P85 $\beta$ , on note la présence d'une boîte riche en prolines supplémentaire absente dans P85 $\alpha$ . Son rôle dans la régulation de P85 $\beta$  reste à établir.

- **Domaines SH2 ; N-SH2 et C-SH2 :**

Les deux domaines SH2 : N-SH2 et C-SH2 sont impliqués dans le recrutement de la PI3K au niveau des récepteurs de facteurs de croissance tel que le PDGF. Ce recrutement passe par l'interaction des domaines SH2, ces derniers ayant une forte affinité pour les phosphoprotéines. Le motif reconnu par ces deux domaines SH2 est de type : Tyr(P)-X-X-méthionine (YXXM) (ces séquences sont retrouvées au niveau du récepteur au PDGF activé). Ces domaines sont donc très importants dans l'activation de la PI3K, puisqu'ils permettent la localisation de l'enzyme à proximité de ses substrats.

Ces domaines n'auraient pas qu'un rôle dans la translocation de la PI3K ; en effet, il a été proposé que ces domaines soient importants pour l'inhibition de l'activité catalytique de P110. L'inhibition du complexe P110-P85 résulterait du repliement conformationnel des domaines SH2, repliement dépendant de l'interaction avec les phosphopeptides. Je développerai davantage cette partie dans la section dédiée aux régulations de P85.

Les domaines SH2 seraient donc très importants dans la régulation de l'activité de la PI3K ; des mutations ou délétions de ces domaines ont d'ailleurs été montrées comme des éléments

## Introduction bibliographique

déclenchant l'oncogénicité de la PI3K (Janssen, Schleithoff et al. 1998; Jimenez, Jones et al. 1998; Borlado, Redondo et al. 2000; Jucker, Sudel et al. 2002).

- **Domaine Inter SH2 :**

Le domaine inter-SH2 est le domaine qui permet la dimérisation avec la sous-unité P110, il interagit avec le domaine de liaison à P85 présent en position amino-terminale de P110.

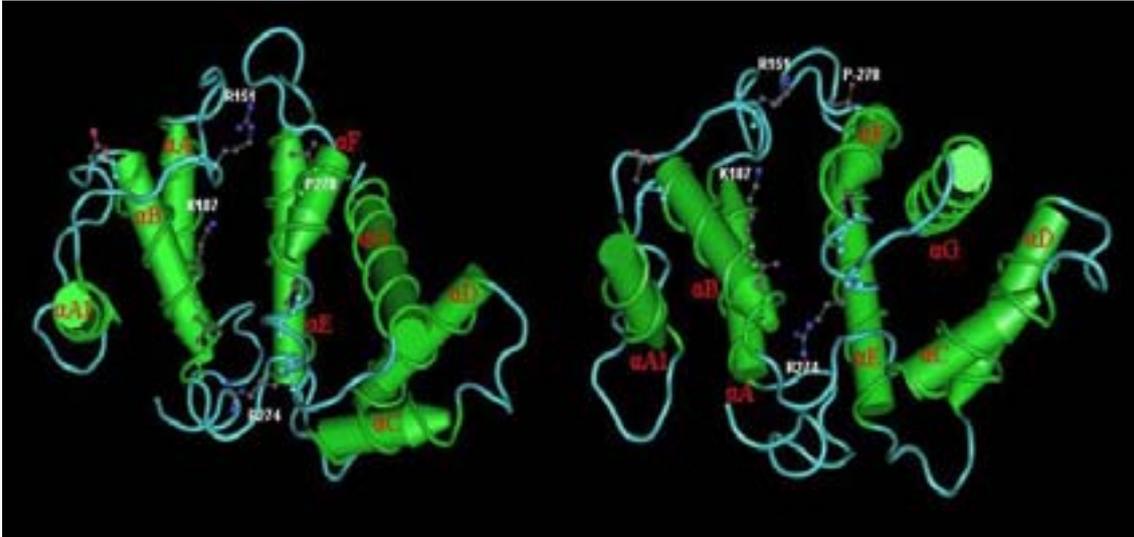
- **Domaine BH :**

P85 fait partie d'une famille de protéines qui contiennent un domaine RhoGAP, ce domaine est aussi appelé Domaine **BH** pour **BCR** (Breakpoint Cluster Region) **H**omology. Un domaine RhoGAP interagit avec les GTPases de la famille Rho et permet leur inactivation en favorisant leur activité GTPasique et donc l'hydrolyse de leur GTP.

Le domaine BH de l'isoforme P85 $\alpha$  a été montré interagissant avec les petites GTPases Rac et Cdc42 (Zheng, Bagrodia et al. 1994; Tolia, Cantley et al. 1995). Cependant, l'activité RhoGAP portée par ce domaine BH est controversée. Il a d'abord été montré que le domaine BH ne portait pas d'activité RhoGAP et donc ne stimulait pas l'activité GTPasique des GTPases (Musacchio, Cantley et al. 1996). Toutefois, le groupe de Anderson a pu montrer récemment que P85 peut stimuler l'activité GTPasique des GTPases de la famille Rab ainsi que des GTPases Rac et Cdc42 par l'intermédiaire du domaine BH (Chamberlain, Berry et al. 2004).

L'équipe qui a résolu la structure du domaine BH a identifié un site putatif responsable de la fixation des petites protéines G. En alignant les séquences des domaines BH de diverses molécules, il apparaît que 3 acides aminés, très bien conservés dans la famille des domaines BH, se trouvent exposés au niveau d'un domaine particulier : le « four helix bundle ». Ces acides aminés Arg-151, Lys-187, Pro-270 plutôt de nature hydrophobe se trouvent dans un contexte également hydrophobe. Cette poche fortement hydrophobe constituée de ces 3 acides aminés très conservés, constituerait le site de liaison aux petites protéines G. D'autres acides aminés sont aussi conservés dans la famille BH, mais ces derniers sont plutôt dispersés dans le domaine et ne forment pas un ensemble, ils sont certainement impliqués dans le maintien de la structure.

L'association de P85 aux GTPases n'est en fait établie que pour l'isoforme alpha. Concernant P85 $\beta$ , seule une publication (Vastrik, Eickholt et al. 1999) met en évidence l'association entre un peptide correspondant aux acides aminés 17-32 de la protéine Rac et le domaine BH de P85 $\beta$  ; par la même approche et avec un peptide correspondant à la région 17-32 de Cdc42, les auteurs ont pu montrer l'association de « Cdc42 » à P85 $\beta$ . S'agissant de P85 $\beta$ , il n'y a donc à ce jour pas de réelle démonstration de cette interaction.



**Figure 8** Domaine BH de P85 alpha généré à partir du logiciel Cn3D, donnée de la structure obtenue d'après (Musacchio, Cantley et al. 1996).

Le domaine BH est donc intéressant par sa capacité à fixer les petites GTPases Rac, Cdc42 et certaines protéines de la famille Rab, le rôle de cette interaction reste à définir. Ce domaine commence à l'acide aminé 105 jusqu'au 319. Dans la littérature, on peut trouver des tailles différentes pour le domaine BH. Il semble cependant que dans son intégralité le domaine BH doit contenir au minimum les 8 hélices alpha le composant. La structure du domaine BH a été résolue par cristallographie en 1996 (Musacchio, Cantley et al. 1996). Le domaine BH peut être divisé en deux sous-domaines : le premier sous-domaine est composé par les hélices  $\alpha A$ ,  $\alpha B$ ,  $\alpha F$  et  $\alpha E$ .  $\alpha A$  et  $\alpha B$  ainsi que  $\alpha F$  et  $\alpha E$  forment une structure en épingle à cheveux qui vont venir se compacter parallèlement pour former le cœur central de ce domaine et à l'extérieur de ce cœur on va retrouver une structure en épingle à cheveux formée par les hélices  $\alpha C$  et  $\alpha D$  qui va venir plaquer l'hélice  $\alpha G$  contre le cœur du domaine du côté des hélices  $\alpha E$  et  $\alpha F$ . Le cœur forme une structure nommée « four-helix bundle » cet assemblage de 4 hélices alpha auraient un rôle dans les interactions protéines-protéines (Kohn, Mant et al. 1997). Des structures similaires sont décrites pour permettre des homodimérisations.

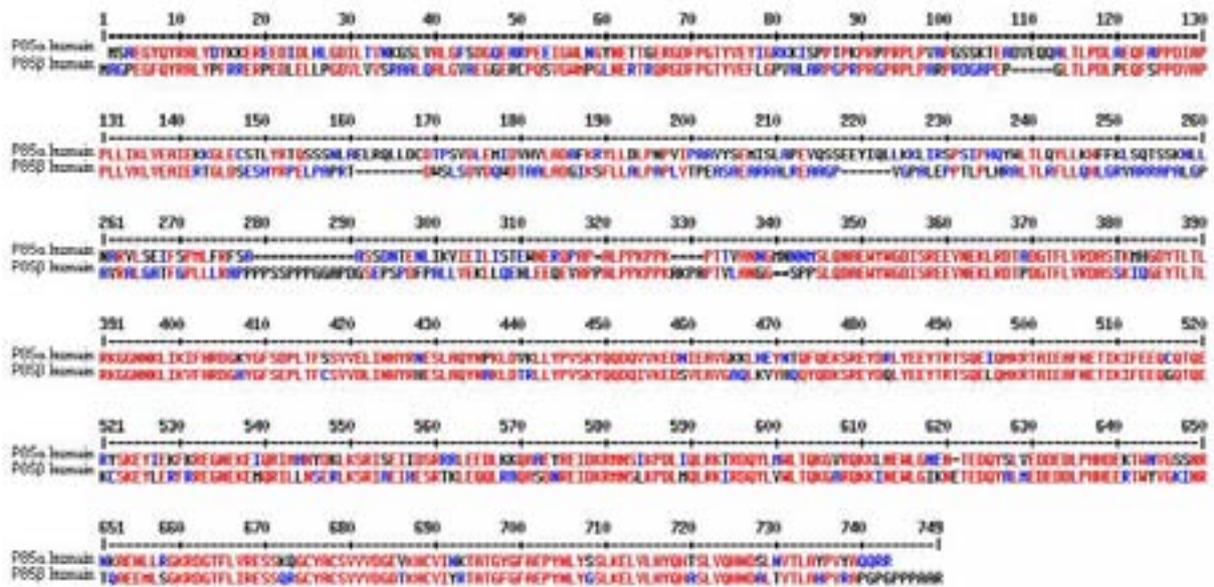
Le cristal du domaine BH de P85 $\alpha$  contient deux monomères, bien que le peptide utilisé ici contienne une boîte riche en proline, ce dernier ne contient pas le domaine SH3, ce qui nous permet d'exclure que la dimérisation passe par l'interaction Proline-SH3. Il semble donc que le domaine BH puisse s'homodimériser dans ces conditions, cette observation faite à partir du cristal a pu être confirmée par la suite. L'équipe de Michael Waterfield (Harpur, Layton et al.

## Introduction bibliographique

1999) a étudié les interactions intermoléculaires de la protéine P85 $\alpha$  et a montré une homodimérisation due au domaine BH. Ils ont pu montrer des homodimérisations dues aux interactions des domaines SH3 avec les boîtes Proline. Une homodimérisation du domaine BH pourrait être un élément régulateur de l'activité de la PI3K. Ainsi l'homodimérisation pourrait avoir un effet « activateur » sur la PI3K, les hétérodimères P110-P85 pourraient s'accumuler dans une zone donnée via l'interaction P85-P85 et stimuler de ce fait la synthèse de PIP3. Néanmoins il n'existe pas à ce jour d'études concernant le rôle de la dimérisation de P85 et son impact sur la régulation de la PI3K.

### **(b) P85 $\alpha$ /P85 $\beta$ , deux isoformes aux fonctions redondantes ?**

Les deux isoformes P85 $\alpha$  et P85 $\beta$  sont structurellement très proches. L'alignement des séquences des deux isoformes, montre une homologie de séquence de 69.6% (et une identité de 57.3%) pour la protéine entière (alignement réalisé par le programme AlignX du logiciel Vector NTi). Le seul site d'hétérogénéité entre ces deux isoformes vient du domaine BH ; en effet, si on refait un alignement de séquence, mais cette fois ci sans tenir compte du domaine BH (pour P85 $\alpha$  acide aminé 110 à 302 et pour P85 $\beta$  106 à 289), on obtient alors une homologie de séquence de 79.5% (et une identité de 67.9%). Enfin, si on compare les domaines BH des deux isoformes, on montre que ces domaines sont peu conservés puisqu'ils ne partagent que 43.8% d'homologie avec seulement 29.9% d'identité (Voir Figure 9). Ce domaine BH pourrait permettre d'apporter des spécificités de fonctions.



**Figure 9** Alignement de séquence des sous-unités régulatrice P85α (P129387) et β (O00459) d'origine humaine. Alignement réalisé avec le programme MultitAlin ("Multiple sequence alignment with hierarchical clustering")

- Similitudes entre les deux isoformes :

Les deux isoformes P85α et P85β proches structurellement ont également des fonctions identiques, ainsi il a été montré que ces deux isoformes sont capables d'être des modulateurs de la voie de signalisation de l'insuline. La perte de l'une ou l'autre des deux isoformes conduit à une hypersensibilité à l'insuline (Terauchi, Tsuji et al. 1999; Ueki, Fruman et al. 2003). Aussi ces deux isoformes ont des fonctions essentielles et redondantes lors du développement (Brachmann, Yballe et al. 2005). Ces exemples montrent que ces deux protéines peuvent occuper des fonctions identiques.

- Différences entre les deux isoformes :

- Il n'existe pas d'analyse comparative des différents interactants pour chaque sous-unité, la plupart des études portent sur l'isoforme P85α. A ce jour, il n'a pas été mis en évidence une spécificité d'interaction pour l'une des deux isoformes.
- P85α et P85β ont un profil d'expression différent ; les membres de l'équipe de Michael Waterfield ont pu montrer la première différence entre ces deux isoformes non pas au niveau de la capacité d'activer la PI3K mais sur leur profil d'expression (Otsu, Hiles et al. 1991). Les auteurs de cet article ont proposé d'après leurs résultats, que l'isoforme beta serait exprimé seulement à 10% comparé à l'isoforme alpha, dans leur modèle d'extraits de cerveau de rats. On peut suspecter que ce ratio n'est pas conservé dans l'ensemble des types

cellulaires et que ce ratio peut également fluctuer en fonction de l'état d'activation des cellules (Okamoto, Namikawa et al. 2004).

- Il existe des données montrant des différences de fonction entre ces deux isoformes. Il a été montré que P85 $\beta$  était phosphorylée sur des résidus thréonine suite à la stimulation du TCR (T Cell Receptor) alors que le profil de phosphorylation de P85 $\alpha$  restait inchangé (Reif, Gout et al. 1993) ; aussi des cellules T, issues des souris KO pour le gène codant pour P85 $\beta$ , une fois stimulées par le TCR, ont un phénotype hyperprolifératif ; les cellules B issues des mêmes souris n'ont quant à elles pas de phénotype particulier. Aussi la délétion du gène codant pour P85 $\alpha$  n'entraîne pas de phénotype particulier chez les cellules T, alors que cette délétion entraîne de sévères défauts dans le développement et la prolifération des cellules B (Fruman, Snapper et al. 1999; Suzuki, Terauchi et al. 1999).

### **(3) Les inhibiteurs des PI3K**

Il existe deux types d'inhibiteur des PI3K, on trouve la wortmannine ainsi que le LY294002. Ces inhibiteurs bloquent l'activité lipide kinase de ces enzymes, (Wortmannine, IC<sub>50</sub>=4.2nM ; LY294002, IC<sub>50</sub>=1.4 $\mu$ M).

- La wortmannine est un inhibiteur non compétitif et irréversible; il interagit de façon covalente avec la lysine 802 présente dans le site de liaison de P110 (isoforme alpha dans ce cas), ce résidu très conservé dans la famille des PhosphoInositides kinases est indispensable à l'activité catalytique.
- Le LY294002 est un inhibiteur compétitif et réversible.

Ces deux inhibiteurs sont très largement employés pour montrer l'implication des PI3K dans certaines réponses cellulaires, cependant il faut garder à l'esprit que ces inhibiteurs ne sont pas spécifiques aux PI3K de classe I puisqu'ils inhibent également d'autres enzymes tels que les PI3K de classe II et III, certaines PI4K, mTor et DNA-PK ; d'où la nécessité d'obtenir des inhibiteurs spécifiques pour chaque classe ou pour chaque isoforme (Knight, Gonzalez et al. 2006). Ainsi il apparaît sur le marché de nouvelles molécules ciblant spécifiquement certains isoformes. A titre d'exemple on trouve les composés PIK-90, PI-103 et PIK-75 pour P110 $\alpha$  (Knight, Gonzalez et al. 2006); la molécule TGX-221 pour P110 $\beta$  (Jackson, Schoenwaelder et al. 2005); AS-252424 et IC87114 pour P110 $\gamma$  (Sadhu, Masinovsky et al. 2003; Condliffe, Davidson et al. 2005); les molécules AS-604850 et AS-605240 pour P110 $\zeta$  (Camps, Ruckle et al. 2005).

#### **(4) Activation des PI3K de classe Ia et leurs fonctions**

##### **(a) Activation des PI3K Ia.**

La régulation de la PI3K de classe Ia passe par la sous-unité régulatrice, celle-ci va permettre la relocalisation du complexe à la membrane à proximité de ses substrats. Cette relocalisation passe par l'interaction de la sous-unité régulatrice avec les récepteurs à activité tyrosine kinase, en effet par l'intermédiaire de ses domaines SH2 la sous-unité régulatrice va se lier aux tyrosines phosphorylées au niveau des récepteurs.

Une autre fonction essentielle de la sous-unité régulatrice est la stabilisation de la protéine P110 labile à 37°C ; en contrepartie de cette stabilisation, l'interaction de la sous-unité régulatrice avec P110 entraîne une inhibition de la PI3K (Yu, Zhang et al. 1998). C'est une inhibition conformationnelle exercée par les domaines SH2 (Shekar, Wu et al. 2005) qui va être levée par la liaison aux récepteurs.

D'autre part, de nombreux facteurs de croissance permettant l'engagement des domaines SH2 de P85 au niveau du récepteur, permettent également l'activation de la GTPase Ras. Cette GTPase induit l'activation de la PI3K par interaction avec P110 (Rodriguez-Viciano, Marte et al. 1996).

L'activité de la PI3K peut être également régulée par un changement de l'état de phosphorylation de la protéine P85. Il est montré que P85 $\alpha$  est phosphorylée sur la tyrosine 688 par la protéine Lck (famille Src) ou bien par la protéine Abl (von Willebrand, Williams et al. 1998). Cette phosphorylation présente dans le domaine C-SH2 permet l'interaction avec le domaine N-SH2 (interaction intramoléculaire ou intermoléculaire) et permet l'activation de la PI3K (Cuevas, Lu et al. 2001).

##### **(b) Fonctions des PI3K Ia.**

###### ***Fonctions liées à l'activité PI3K***

Il est montré qu'une dérégulation de la PI3K corrèle avec l'apparition de cancers (Vivanco and Sawyers 2002). Les niveaux de PIP3 augmentent suite à la transformation induite par des oncogènes tels que v-src ou l'antigène moyen T (mT) des virus de polyome (Whitman, Kaplan et al. 1985). Il existe aussi des oncogènes dérivant des sous-unités catalytiques (Shayesteh, Lu et al. 1999; Bachman, Argani et al. 2004; Broderick, Di et al. 2004; Campbell, Russell et al. 2004; Samuels, Wang et al. 2004) ou régulatrices (Jimenez, Jones et al. 1998; Borlado, Redondo et al. 2000; Luo and Cantley 2005; Shekar, Wu et al. 2005). Il est également observé des dérégulations des protéines qui contrecarrent les effets des PI3K. Ainsi

## Introduction bibliographique

PTEN, suppresseur de tumeur, est trouvée mutée dans de nombreux cancers (Cantley and Neel 1999; Parsons 2004).

Enfin parmi les effecteurs des PI3K, on trouve la protéine Akt, protéine impliquée dans les mécanismes de survie cellulaire.

Les fonctions des PI3K concernent également la signalisation de l'insuline. La PI3K est requise pour permettre le transport du glucose dans les muscles et dans le tissu adipeux et elle est nécessaire à l'inhibition de la production du glucose par les cellules du foie. Ainsi des mutations sur la PI3K peuvent avoir des conséquences sévères et entraîner des diabètes de type 2.

Enfin la PI3K est également impliquée dans le développement, il a été montré que la voie PI3K régule la taille du cœur ainsi que sa fonction (Luo, McMullen et al. 2005).

### ***Fonctions liées à P85***

*(fonctions résumées dans la Figure 10)*

La fonction de P85 ne se restreint pas essentiellement au recrutement de l'hétérodimère P110-P85 au niveau des récepteurs afin que la PI3K soit en proximité de ses substrats. P85 par ses nombreux domaines exerce un réel rôle de régulation sur l'activité PI3K. Comme je le mentionnais auparavant, son premier rôle est de stabiliser P110. Ensuite P85 au travers de ces interactions va soit favoriser l'activation de la PI3K, soit la défavoriser.

L'interaction de P85 $\alpha$  avec certaines protéines comme Ruk qui se lie au domaine SH3 entraîne l'inhibition de la PI3K (Gout, Middleton et al. 2000). Les protéines de la famille Src Lyn et Fyn interagissent avec les boîtes Proline de P85, cette interaction va permettre d'activer la PI3K (Pleiman, Hertz et al. 1994). L'interaction des GTPases Rac et Cdc42 (sous forme active) influe sur l'activité PI3K (Zheng, Bagrodia et al. 1994; Toliás, Cantley et al. 1995), aussi ces interactions pourraient tout simplement jouer sur la localisation de la PI3K.

Il a été montré que P85 interagit avec la protéine SHIP-1 (SH2 domain-containing inositol 5' phosphatase 1) au niveau du BCR (B Cell Recepteur) et que cette interaction est simultanée à une diminution de la quantité de PIP3; on note alors un rôle antagoniste de P85 par rapport à celui de la PI3K.

P85 se lie à la protéine Cbl, cette interaction pourrait activer la PI3K (Standaert, Sajan et al. 2004); d'autre part cette interaction de P85 avec Cbl (Hartley, Meisner et al. 1995) pourrait avoir une autre fonction: en effet, Cbl est une E3 ubiquitine ligase, l'interaction P85-Cbl pourrait permettre la dégradation des protéines associées à P85 (Sanjay, Horne et al. 2001). Encore, P85 pourrait être un régulateur des GTPases, soit en régulant leur localisation via

## Introduction bibliographique

l'interaction par le domaine BH, soit en inhibant les GTPases par la stimulation de leur activité GTPasique intrinsèque par ce même domaine BH (Chamberlain, Berry et al. 2004).

Les travaux de l'équipe de Cantley sur l'impact des sous-unités régulatrices P85 sur la signalisation de l'insuline montrent que P85 peut être un inhibiteur de cette voie indépendamment de son rôle de régulateurs de la PI3K (Brachmann, Ueki et al. 2005). Une lignée de cellule obtenue à partir d'une leucémie (lymphocyte T Jurkat) montre un phénotype prolifératif associée à une phosphorylation de P85, or ni la wortmanine ni le LY294002 n'inhibe le phénotype prolifératif et la phosphorylation de P85, montrant que P85 est associée au phénotype prolifératif et que son rôle est indépendant de la PI3K (Martinez-Lorenzo, Anel et al. 2000).

Enfin, il a été montré que P85 $\alpha$  pouvait stimuler, indépendamment de la PI3K, des voies impliquées dans le réarrangement du cytosquelette (Jimenez, Portela et al. 2000; Hill, Huang et al. 2001) mais je reviendrai un peu plus en détail sur ce sujet en introduction du chapitre 4.

Ces nombreux exemples montrent que le rôle de la sous-unité régulatrice P85 ne se restreint pas à un régulateur de l'activité de la PI3K, et que l'on peut considérer la sous-unité P85 comme une protéine de signalisation à part entière. L'étude de son rôle dans la signalisation reste difficile à aborder, premièrement par la présence des 5 isoformes et deuxièmement par le fait qu'il n'est pas toujours aisé de dissocier les effets propres de P85 par rapport à la PI3K.

<b>PARTENAIRES DE LIAISON DE P85 REGULANT LA PI3K.</b>	
Ruk	<b>Inhibition PI3K</b> (Gout, Middleton et al. 2000).
Lyn et Fyn	<b>Activation PI3K</b> (Pleiman, Hertz et al. 1994).
Rac et Cdc42	<b>Activation PI3K</b> (Zheng, Bagrodia et al. 1994; Tolias, Cantley et al. 1995).
Cbl	<b>Activation PI3K</b> (Standaert, Sajan et al. 2004).
<b>FONCTIONS DE P85 INDEPENDEMMENT DE LA PI3K,</b>	
<ul style="list-style-type: none"> <li><b>VIA DES PARTENAIRES D'INTERACTION.</b></li> </ul>	
Cbl	P85 servirait à cibler certaines protéines pour être dégradées (Sanjay, Horne et al. 2001).
SHIP-1	Stimulation de l'activité SHIP ; diminution des PIP3.
Rac / Cdc42	P85 stimulerait l'activité GTPasique des GTPase et donc le retour vers leur état inactif (Chamberlain, Berry et al. 2004).
<ul style="list-style-type: none"> <li><b>SANS PARTENAIRES.</b></li> </ul>	
P85	Rôle inhibiteur sur la signalisation de l'insuline ; par titration des récepteurs (Brachmann, Ueki et al. 2005).
P85	Rôle pro-prolifératif lié à une phosphorylation de P85 (Martinez-Lorenzo, Anel et al. 2000).
P85	Réarrangement du cytosquelette d'actine. (Jimenez, Portela et al. 2000; Hill, Huang et al. 2001)

**Figure 10 Récapitulatif des fonctions liées à P85.**

### **3. La famille des Rho GTPases et la protéine Rac**

#### **a) Les GTPases monomériques - définitions**

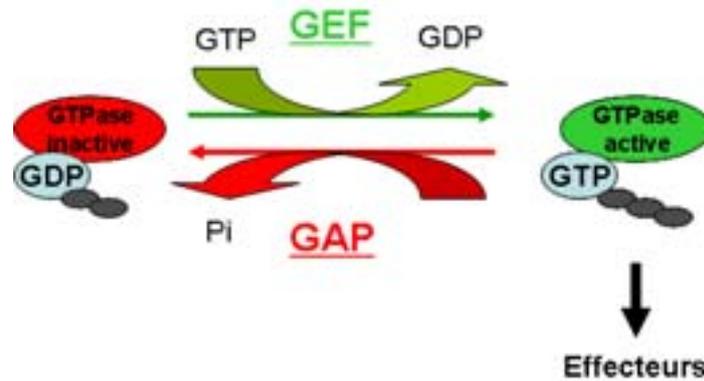
Les petites protéines G ou petites GTPases, protéines liant les nucléotides GTP ou GDP et possédant une activité GTPasique, représentent une grande famille constituée d'une centaine de molécules. Cette famille, présente chez tous les organismes eucaryotes, est divisée en cinq sous familles : Ras, Rho, Rab, Sar1/Arf et Ran. Les petites GTPases régulent de très nombreux processus biologiques et de part leur mode d'action, sont capables d'initier, de terminer et donc de réguler la durée de fonctions cellulaires spécifiques. En plus de l'aspect temporel, ces molécules exercent une régulation spatiale des fonctions cellulaires qu'elles gèrent. On peut attribuer à chacune des sous-familles des fonctions cellulaires spécifiques. Les membres de la famille Ras sont impliqués dans la régulation de l'expression des gènes ; Rho/Rac/Cdc42 (famille Rho) régulent l'organisation du cytosquelette mais aussi l'expression de gènes (Schwartz 2004; Hall 2005; Jaffe and Hall 2005); les protéines des familles Rab et Sar1/Arf sont elles impliquées dans la régulation du trafic vésiculaire ; quant à la famille Ran, ses membres interviennent lors des transitions entre phases du cycle cellulaire (Wennerberg, Rossman et al. 2005).

D'un point de vue structural, l'ensemble des petites protéines G partage une grande homologie de séquence pour les domaines liant le GDP ou le GTP ainsi que pour le domaine qui porte l'activité GTPasique. Cette classe de molécules porte un domaine d'interaction avec les effecteurs, et certains membres tels que Ras, Rho/Rac/Cdc42 et Rab ont en partie carboxy terminale un domaine subissant des modifications post-traductionnelles. Ces modifications de nature lipidique peuvent être une géranylgéranylation, une farnésylation, une palmitoylation ou bien une méthylation ou une combinaison de ces modifications. Ces modifications interviennent dans la localisation subcellulaire de ces protéines.

Par leur capacité à fixer les nucléotides GDP et GTP, les petites protéines G connaissent deux états d'activation. La forme liant le GDP est dite inactive car incapable d'interagir avec ses effecteurs et la forme liant le GTP est dite active car elle peut interagir avec ses effecteurs. Pour ces raisons, ces molécules sont considérées comme de réels interrupteurs moléculaires. Un cycle d'activation et d'inactivation correspond au passage entre les formes liées au GTP ou au GDP, un signal en amont va permettre la dissociation du GDP, immédiatement suivie par la liaison du GTP (qui est beaucoup plus abondant que le GDP dans la cellule), cette liaison conduit à un changement conformationnel de la GTPase permettant ainsi l'interaction

avec les effecteurs et donc leur activation, le retour à l'état inactif passe par l'hydrolyse du GTP effectuée par l'activité GTPasique de la GTPase elle-même.

Pour jouer leur rôle d'interrupteur, il faut que les GTPases puissent passer de leur état inactif-actif et inversement rapidement ; cette accélération de la transition est réalisée par les GEFs et les GAPs (Voir Figure 11).



**Figure 11 Schéma d'activation des petites GTPases.** La forme inactive associée au GDP passe sous la forme active par fixation du GTP, cet échange est réalisé par l'intermédiaire des GEF. Le retour vers la forme inactive est accéléré par les GAP.

## **b) Régulation des GTPases monomériques.**

### **(1) Les GEFs : Guanine Nucleotide Exchange Factors.**

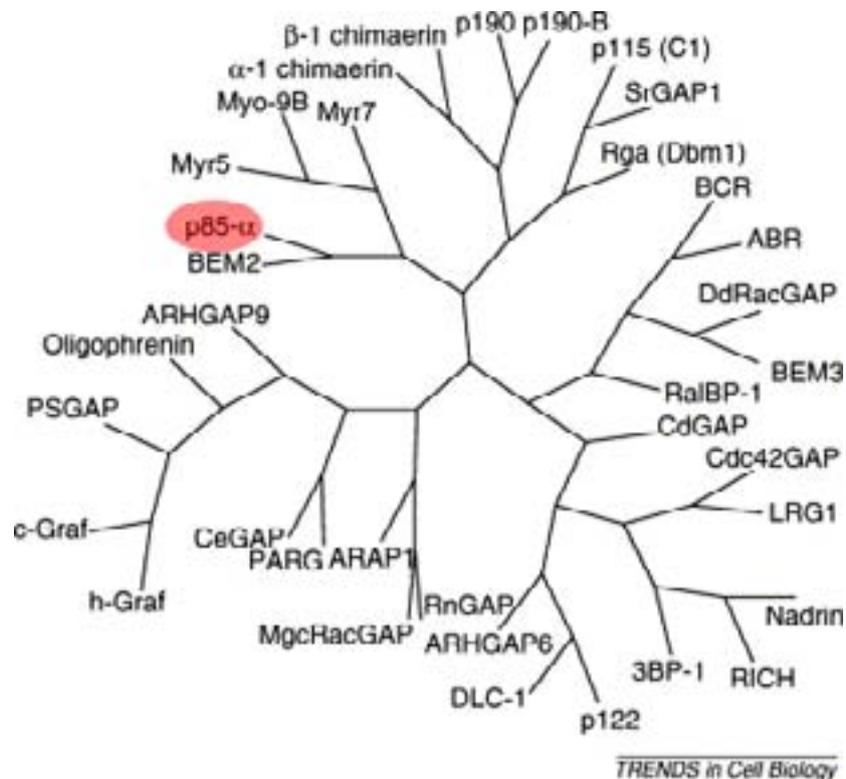
La régulation des GTPases dépend de protéines d'échange les GEFs qui permettent l'échange du GDP par du GTP. Les GEFs vont faciliter la dissociation du GDP, stabiliser l'état de transition de la GTPase sans nucléotide ce qui permet ainsi le chargement du GTP. Le GTP fixé, la GEF se dissocie de la GTPase. Les signaux en amont de la GTPases sont importants dans le choix de la GEF et dans le choix des processus moléculaires contrôlés par la GTPase. Il existe un grand nombre de GEFs qui ont chacune des GTPases cibles bien précises

### **(2) Les GAPs : GTPase Activating Proteins.**

Les GAPs ou GTPase-Activating Proteins, augmentent l'activité intrinsèque d'hydrolyse du GTP des GTPases, ce qui permet ainsi le retour de la GTPase vers son état inactif. Les GAPs contiennent souvent de nombreux autres domaines d'interaction avec d'autres protéines ou des domaines de liaison à des lipides pour permettre la relocalisation membranaire. Les GAP seraient également des effecteurs des GTPases, ces protéines pourraient exercer un rôle de signalisation indépendamment de leur fonction GAP. C'est le cas de la N-chimerine qui en interagissant avec Rac et Cdc42 permet d'induire des lamellipodes et filopodes indépendamment de sa fonction GAP (Kozma, Ahmed et al. 1996).

## Introduction bibliographique

Les Rho-GAP sont définies par la présence d'un domaine Rho GAP (environ 150 acides aminés) très conservé. Comme nous l'avons vu précédemment la protéine P85 $\alpha$  a été définie comme un membre de la famille des protéines Rho-GAP, la fonctionnalité du domaine Rho-GAP de P85 $\alpha$ , également nommé BH, reste à éclaircir. Les données de la littérature sont en désaccord : En premier lieu, il a été établi que le domaine BH n'avait pas d'activité GTPasique (Zheng, Hart et al. 1993; Zheng, Bagrodia et al. 1994) puis récemment il a été montré l'inverse (Chamberlain, Berry et al. 2004). La protéine P85 tout comme la N-chimerine pourrait avoir un rôle en tant qu'effecteur de Rac ou Cdc42 indépendamment de son activité GAP.



**Figure 12** Arbre phylogénétique des protéines de la famille Rho-GAP. Réalisé à partir de l'homologie de séquence des domaines Rho-GAP. (D'après (Moon and Zheng 2003))

### **(3) GDIs : GTP Dissociation Inhibitors.**

Grâce à des modifications post-traductionnelles qui sont indispensables à la fonction des GTPases et qui conduisent à l'ajout de groupements lipidiques à l'extrémité carboxy-terminale, les Rho-GTPases vont s'associer aux membranes. Malgré ces modifications, les GTPases restent majoritairement cytosoliques retenues dans le cytosol par les Rho-GDI qui masquent cette séquence d'ancrage aux membranes. Les GDI interviennent dans la régulation des mouvements des GTPases entre le cytosol et les membranes.

### c) La famille des Rho GTPases

Les membres de la famille des Rho GTPases tiennent un rôle très important dans la cellule. On estime qu'environ 1% du génome humain code pour des protéines qui interagissent, régulent ou sont régulées par les membres de la famille des Rho GTPases. Ces protéines régulent de nombreux processus fondamentaux de la cellule tels que la morphogénèse, la polarité cellulaire, la division cellulaire ou bien encore la migration cellulaire.

Pour l'heure, cette famille dénombre 22 gènes codant pour des Rho GTPases. Elles sont classés selon leur homologie de séquence en 6 groupes principaux ; **les GTPases de type Rho** : 3 isoformes Rho A, B, et C ; **de type Rac** : 3 isoformes Rac 1, 2, et 3 et RhoG ; **de type Rnd** : Rnd1, Rnd2, RhoE/Rnd3 ; **de type Cdc42** : Cdc42, TC10, TCL, Wrch-1, 2 et Chp ; **de type RhoBTB** : RhoBTB1, et 2; **les GTPases de type Miro** : Miro -1 et 2.



**Figure 13 Arbre phylogénétique des Rho-GTPases.**

D'après Wennerberg, K. et al. J Cell Sci 2004;117:1301-1312

### d) La protéine Rac

Il existe trois isoformes de Rac : Rac 1, 2 et 3 plus un variant d'épissage de Rac1: Rac1b. Rac1 est une protéine ubiquitaire alors que Rac 2 est préférentiellement exprimée dans les cellules hématopoïétiques, la protéine Rac 3 est quant à elle exprimée abondamment dans les neurones. Au cours de ma thèse, je me suis intéressé plus particulièrement à l'isoforme Rac1 et à un degré moindre à l'isoforme hématopoïétique Rac2. Les protéines Rac régulent de nombreuses fonctions cellulaires importantes : la régulation du cytosquelette d'actine, la

régulation des contacts cellule-cellule et de l'adhérence, l'activation de la transcription et de la traduction, la synthèse protéique, la survie cellulaire et la régulation du cycle cellulaire (Bishop and Hall 2000; Etienne-Manneville and Hall 2002).

L'activation de Rac est dépendante de multiples signaux, facteurs de croissance, intégrines, tensions cellulaires, adhérence.

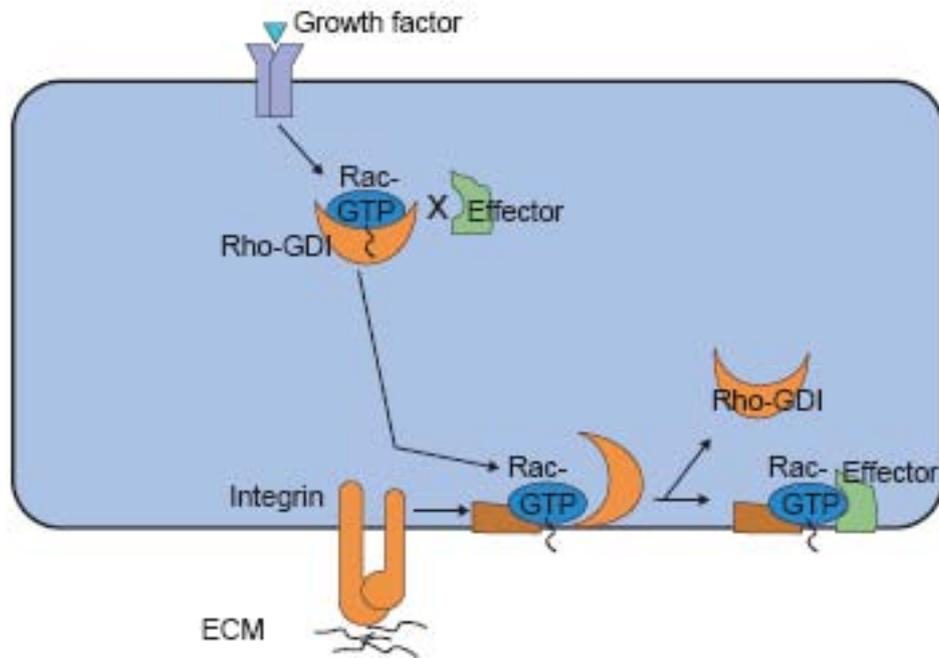
***(1) Régulation de Rac par sa localisation.***

L'activité de Rac est dépendante de sa fixation au GTP ; sous cette forme la GTPase est active. La fixation des nucléotides dépend des GAPs et des GEFs. En plus des régulations qui ne concernent que la fixation des nucléotides, il y a aussi une régulation de la localisation de la GTPase. Une localisation précise de la GTPase est un élément important dans sa régulation puisque cela va déterminer les effecteurs avec lesquels elle va interagir préférentiellement. La régulation de la localisation de la GTPase Rac passe par les protéines GDI. Rac est maintenue dans le cytoplasme par le biais de son interaction avec les RhoGDI. L'adhérence permet via les intégrines la dissociation de Rac et de la protéine GDI permettant ainsi l'interaction de Rac avec ses effecteurs (Del Pozo, Kiosses et al. 2002) (Voir Figure 14).

Le modèle de la littérature est le suivant :

- Rac actif est piégé par les GDIs et demeure cytosolique. Cette forme active de Rac cytosolique est ainsi incapable d'interagir avec ses effecteurs.
- En réponse à un stimulus (adhérence/engagement des intégrines ou facteurs de croissance) la protéine Rac est libérée de son interaction avec la GDI et peut ainsi interagir avec ses effecteurs au niveau des membranes.

Il a été montré qu'en réponse à l'adhérence et donc de l'interaction des intégrines avec la MEC, il y a création de domaines membranaires (riches en cholestérol) qui permettent la translocation de la GTPase Rac aux membranes et l'activation de ses effecteurs. Une cellule rendue non adhérente perd ces domaines particuliers ainsi Rac ne peut plus activer ses effecteurs (del Pozo, Alderson et al. 2004).



**Figure 14 La localisation de Rac et son interaction avec ses effecteurs est régulée par les intégrines.** Les facteurs de croissance permettent l'activation de Rac, mais les Rho-GDI séquestrent Rac-GTP dans le cytoplasme et bloquent de ce fait l'interaction de Rac avec ses effecteurs. Les intégrines permettent une relocalisation de Rac au niveau des membranes, sa dissociation aux Rho-GDI ce qui conduit finalement à l'interaction de Rac avec ses effecteurs. (d'après (Del Pozo, Kiosses et al. 2002)

## **(2) Rac – Cytosquelette – Adhérence.**

La protéine Rac et les GTPases de la famille Rho sont impliquées dans les mécanismes d'adhérence par la régulation qu'elles exercent sur le cytosquelette d'actine. Les GTPases Rho, Rac et Cdc42 contrôlent l'organisation du cytosquelette en réponse à différents stimuli. Rho est responsable de la formation de fibres de stress, longs faisceaux d'actine permettant l'attachement à la matrice extracellulaire via les contacts focaux. La protéine Cdc42 permet la formation de protrusions membranaires comme les microvillosités et les filopodes qui sont de minces prolongements membranaires composés d'un filament d'actine. Enfin la GTPase Rac est requise pour la formation des lamellipodes et des ruffles (renflements membranaires) (Ridley and Hall 1992; Ridley, Paterson et al. 1992; Nobes and Hall 1995). La formation de ces structures d'actine est associée à la formation des structures d'adhérence telles que les complexes focaux, les contacts focaux et les podosomes. Rac et Cdc42 régulent l'organisation du cytosquelette d'actine par l'intermédiaire de la PI3K et des sérine/thréonine kinases PAK (P21 Activated Kinase). Rac et Cdc42 permettent la régulation du complexe Arp2/3 qui permet la nucléation et la polymérisation de l'actine.

Il existe un lien étroit entre le cytosquelette et les GTPases et Rac en particulier. Comme je le présentais précédemment Rac peut induire la formation de structures particulières du

## Introduction bibliographique

cytosquelette, mais a contrario le cytosquelette régule aussi Rac. Ainsi un changement dans l'état d'adhérence lors de la migration ou tout simplement d'un détachement de la cellule va induire une réorganisation du cytosquelette, des microtubules mais aussi un changement des tensions exercées sur la cellule ; ces facteurs influent sur l'activation des GTPases dont Rac et sur leurs possibilités d'activer leurs effecteurs (Ren, Kiosses et al. 1999; Waterman-Storer, Worthylake et al. 1999; Katsumi, Milanini et al. 2002; del Pozo, Alderson et al. 2004).

### **(3) Rac et Survie cellulaire**

Les petites GTPases Rac (et Cdc42) ont pu être décrites dans plusieurs modèles comme des molécules distribuant des signaux de survie. Rac peut activer des molécules clef dans les mécanismes de survie cellulaire ; cette GTPase permet l'inactivation de la protéine P53 puissant inducteur de l'apoptose quand elle est activée, elle permet aussi l'activation de la protéine Akt connue comme médiateur de la survie cellulaire. Cependant, dans d'autres types cellulaires et surtout d'autres conditions, Rac peut induire l'apoptose (lores 1997, kawazoe 1999, Subauste 2000).

### **(4) Mutants de Rac et Cdc42.**

Il existe deux sortes de mutants des GTPases : les formes constitutivement actives souvent identifiées en premier lieu comme des oncogènes et les formes à caractère dominant-négatifs.

#### Les formes constitutivement actives :

Ces formes sont défectueuses dans leur activité GTPasique intrinsèque et elles ne sont retrouvées que sous leur forme GTP. Ces mutants sont: V12Rac et V12Cdc42 ou L61Rac et L61Cdc42.

#### Les formes dominant-négatives :

Ces mutants se lient préférentiellement au GDP, ainsi ils séquestrent les GEFs désormais indisponibles pour activer les GTPases non mutées lors d'une stimulation cellulaire. Ces mutants sont: N17Rac et N17Cdc42.

**(5) Rac et la PI3K de classe Ia**

Les voies de signalisation de Rac et de la PI3K concernent souvent les mêmes fonctions cellulaires, ceci suggère un lien entre ces deux voies de signalisation.

- La PI3K agit en amont de Rac pour l'activer :

La démonstration du lien entre Rac et la PI3K est venue de l'étude de la formation des « ruffles » suite à la stimulation de cellules par le PDGF (Platelet-Derived Growth Factor). Après stimulation par le PDGF, la formation des « ruffles » est inhibée après ajout d'un inhibiteur des PI3K. Cette inhibition est contournée par la transfection d'une forme active de Rac (Hawkins, Eguinoa et al. 1995). Par la suite, il a été démontré que la PI3K était nécessaire à l'activation de Rac pour de nombreuses autres fonctions cellulaires.

Cette régulation de l'activité de Rac est réalisée par l'activation de ses GEFs. Il a pu être démontré que ces dernières pouvaient être activées par la PI3K. Les GEFs portent un domaine PH (Pleckstrin Homology) ayant une affinité pour les PIP3. Suite à l'interaction du domaine PH avec les PIP3, la GEFs devient active et peut ainsi activer Rac. Sos, Tiam, Vav, Dock180, P-REX1 et 2 (Welch, Coadwell et al. 2002; Donald, Hill et al. 2004) sont des GEFs régulées par la PI3K.

De plus, Rac peut se lier directement au PIP3, cette liaison facilite la dissociation du GDP (Missy, Van Poucke et al. 1998). Néanmoins, cette réaction n'est montrée qu'in-vitro avec de très fortes concentrations de PIP3 de 50  $\mu\text{M}$ , la concentration cellulaire étant sûrement plus proche de 1  $\mu\text{M}$ .

- Rac en amont de la PI3K :

Certains éléments laissent penser que Rac pourrait activer à son tour la PI3K, il a été montré que Rac et Cdc42 induisent un phénotype invasif et motile à des cellules épithéliales via l'activation de la PI3K (Keely, Westwick et al. 1997). Il a également été montré que l'interaction de Rac et de la PI3K (probablement par l'intermédiaire du domaine BH de P85) augmente l'activité de la PI3K de 2 à 9 fois in vitro (Bokoch, Vlahos et al. 1996). Enfin, dans des neutrophiles, la surexpression d'une forme active de Rac permet l'accumulation de PIP3 au niveau de la membrane plasmique ; néanmoins, la démonstration directe de l'activation de la PI3K n'est pas établie (Srinivasan, Wang et al. 2003).

#### 4. La protéine Akt (PKB)

La protéine Akt dénommée également PKB pour Protein Kinase B peut être activée par une multitude de signaux. Akt au travers de son activité serine/thréonine kinase, est un acteur principal dans la régulation du métabolisme, de la migration, de la transcription des gènes, du cycle cellulaire et enfin de la survie cellulaire (voir Figure 15).

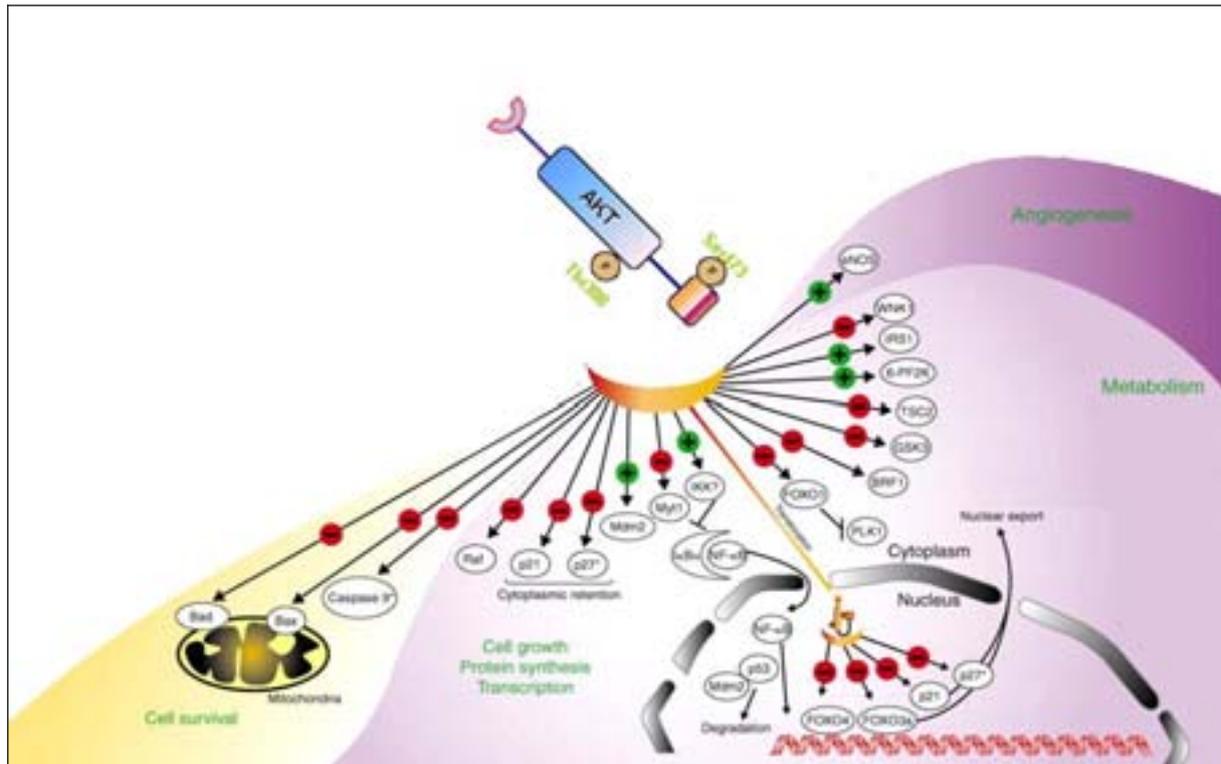


Figure 15 Différentes voies régularisées par Akt. (Adapté de (Fayard, Tintignac et al. 2005)

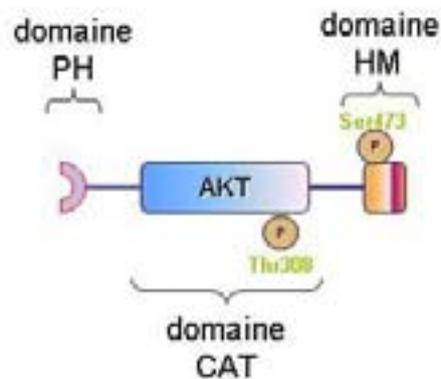
##### a) Définition

La découverte de la protéine Akt s'est faite simultanément par deux équipes de recherche en 1991 : l'une d'elle travaillant sur la recherche de protéines homologues aux Proteines Kinase A (PKA) et aux Proteines Kinase C (PKC) a identifié une protéine qu'ils ont alors nommée PKB ; l'autre équipe a identifié l'oncogène c-Akt dont une protéine similaire v-akt protéine de virus connue pour induire des cancers chez les souris. Par la suite, en 1995, Akt a été décrite comme étant une cible directe de la PI3K (Franke, Yang et al. 1995).

Sous le terme Akt/PKB se trouve en fait 3 isoformes, Akt1, Akt2 et Akt3 (respectivement PKB $\alpha$ , PKB $\beta$  et PKB $\gamma$ )

### **b) Rôle et Structure**

Akt appartient à la famille des protéines kinases **AGC** (regroupe les protéines kinase **AMP** et **GMP** dépendantes ainsi que les protéines kinase **C**) ; cette protéine est composée de trois grands domaines : en position amino-terminale, on trouve le domaine **PH** pour **Pleckstrin Homology**, en position centrale on trouve le domaine catalytique **CAT** et enfin on trouve l'extension C-terminale **EXT** qui contient un élément régulateur **HM** pour **Motif Hydrophobe**. Tous ces domaines sont extrêmement conservés entre les 3 isoformes de la protéine Akt, de plus le domaine **CAT** et l'extension N-terminale **EXT** sont apparentés aux domaines des protéines de la famille **AGC** tels que les **PKA**, les **PKC** ou encore les protéines **SGK** (voir Figure 16).



**Figure 16 Représentation schématique de la protéine kinase Akt.** En position amino-terminale se trouve le domaine PH pour Pleckstrin Homology, vient ensuite le domaine catalytique CAT, puis en position carboxy-terminale le domaine HM hydrophobic Motif.

### **c) Régulation de l'activité de la protéine Akt**

Les 3 isoformes d'Akt contiennent deux sites de phosphorylation : la thréonine 308 dans la boucle activatrice et la sérine 473 dans le domaine régulateur C-terminal HM. L'activation de la protéine kinase Akt passe par deux étapes clefs, qui impliquent la PI3K et une translocation membranaire dépendante du domaine PH, suivies par la phosphorylation des deux sites de phosphorylation. La phosphorylation du site Thr308 active partiellement Akt, mais les deux sites doivent être phosphorylés pour qu'Akt soit pleinement active. Aussi, il a été découvert de nombreuses protéines se liant à Akt afin de réguler son activité, tels que CTMP, TCL1, Posh, etc.

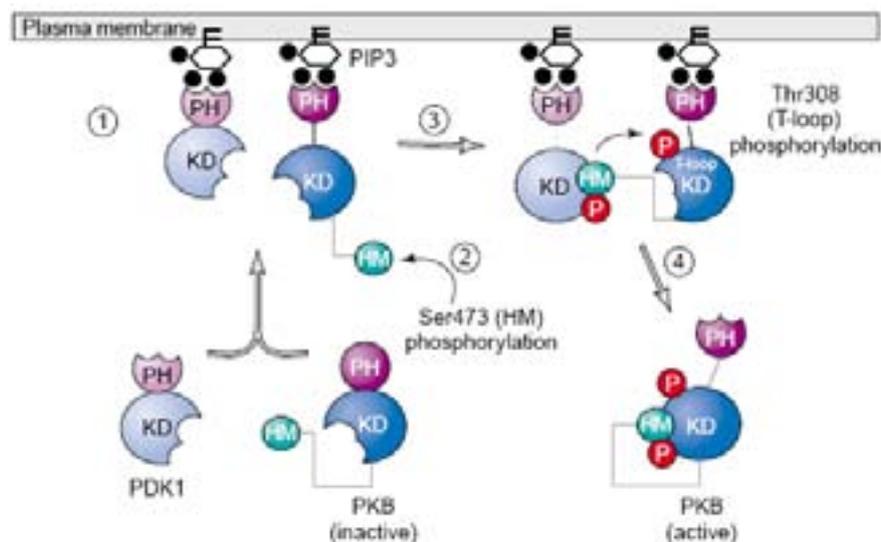
#### **(1) Régulation PI3K dépendante**

Comme j'ai pu le décrire précédemment dans le chapitre dédié à la PI3K, l'activité PI3K va générer la synthèse et l'accumulation au niveau membranaire de PIP3. Le domaine PH

## Introduction bibliographique

présent dans Akt, retrouvé également dans de nombreuses autres protéines tels que PDK1, a une affinité pour les phospholipides de type PtdIns(3,4,5)P3 et PtdIns(3,4)P2 (Lemmon and Ferguson 2000; Thomas, Deak et al. 2002). Les PhosphoInositides PtdIns(3,4,5)P3 et PtdIns(3,4)P2 vont recruter via le domaine PH la forme cytosolique d'Akt à la membrane plasmique, ce recrutement membranaire va induire un changement conformationnel d'Akt permettant la phosphorylation du site Thr308 par la protéine kinase PDK1. PDK1 elle-même étant recrutée par les PtdIns(3,4,5)P3 et PtdIns(3,4)P2.

Le mécanisme qui induit la phosphorylation en Ser473 ne serait pas unique. La dépendance de l'activité PI3K n'est pas remise en cause, mais c'est l'identité de la protéine qui phosphoryle ce site qui reste à déterminer. D'après les études menées sur la recherche de la Ser473-kinase, il ressort qu'il n'y aurait pas une mais plusieurs kinases responsables de cette phosphorylation. Parmi les kinases candidates on trouve : PDK1 (Balendran, Casamayor et al. 1999), ILK (Troussard, Mawji et al. 2003), DNA-PK (Feng, Park et al. 2004), PKC $\beta$ II (Kawakami, Nishimoto et al. 2004), le complexe TORC2 (mTor-rictor) (Sarbasov, Guertin et al. 2005; Jacinto, Facchinetti et al. 2006; Sarbasov, Ali et al. 2006) enfin il est également proposé qu'Akt elle-même induirait cette phosphorylation (Toker and Newton 2000). La séquence des phosphorylations de la protéine Akt est présentée dans la Figure 17, ici la phosphorylation sur la Ser473 se fait en premier mais dans la littérature, l'inverse peut être trouvé et ces vues divergentes reflètent une connaissance non complète quant aux mécanismes d'activation de la protéine Akt.



**Figure 17 Schéma d'activation de la protéine kinase Akt.** 1) La PI3K active induit la formation de PIP3 au niveau de la membrane, ce qui permet le recrutement de PDK1 ainsi qu'Akt. 2) Sur Akt, la Ser473 est phosphorylée par PDK2 ce qui induit un changement conformationnel d'Akt. 3) Ce changement conformationnel va promouvoir, sans être indispensable, la capacité de PDK1 à phosphoryler la Thr308. 4) Akt doublement phosphorylé est alors pleinement active. *Adapté de James R Woodgett, 2005, Current Opinion in Cell Biology.*

**(2) Voie PI3K indépendante**

Akt peut être activée via la PKA ; cette activation serait PI3K indépendante puisque la wortmannine n'a aucun effet sur l'activation d'Akt induite en présence d'AMPc.

Le mécanisme d'activation dépendant de la PKA reste à éclaircir : il serait indépendant du domaine de PH, ne nécessiterait pas la phosphorylation Ser473 mais dépendrait toujours de la phosphorylation en Thr308 (Filippa, Sable et al. 1999).

**(3) Les protéines qui se lient et régulent Akt**

Sachant l'importance physiologique de la protéine Akt, la recherche de partenaires d'interaction a été prolifique. Cette recherche a permis d'identifier plusieurs molécules capables de réguler l'activité de la protéine Akt. Ceci a permis de montrer que la régulation d'Akt ne dépendait pas seulement de l'activité de la PI3K mais qu'elle est beaucoup plus complexe. J'ai recensé un certain nombre de ces régulateurs de l'activité d'Akt.

**(a) Activateurs d'Akt.**

TCL1

TCL1 (T-cell leukemia/lymphoma) est une protéine mal connue ; elle a été décrite comme un oncogène mais sa fonction physiologique est encore inconnue. Son rôle serait d'augmenter l'activité de la protéine Akt en formant un hétérodimère avec Akt (Laine, Kunstle et al. 2000). TCL1 interagit avec le domaine PH de la protéine Akt, mais cette interaction n'empêche pas la liaison du PH aux PIP3. TCL1 peut s'homodimériser et chacun des monomère peut lier une protéine Akt, l'oligomérisation d'Akt pourrait permettre une transactivation de chaque monomère d'Akt (Laine, Kunstle et al. 2002).

Grb10

Grb10 (Growth factor receptor-binding protein-10) est une molécule adaptatrice composée d'un domaine PH nécessaire à l'interaction avec Akt et d'un domaine SH2. Ce dernier peut se lier aux récepteurs à activité Tyrosine kinase et serait nécessaire à l'activation d'Akt suite à l'activation de ces récepteurs (Jahn, Seipel et al. 2002).

**(b) Inhibiteurs d'Akt.**

JIP1

JIP1 (JNK interacting protein 1) fait partie de la voie de signalisation de JNK et est nécessaire à son activation. Cette voie JNK est impliquée dans l'induction de l'apoptose. Akt a été montrée comme séquestrant JIP1 inhibant ainsi la voie JNK. D'autres études montrent également que JIP1 pourrait se lier à Akt pour inhiber son activité (Song and Lee 2005).

CTMP

La protéine CTMP (Carboxyl-Terminal Modulator Protein) est un inhibiteur d'Akt. En se liant à la partie carboxy terminale d'Akt, CTMP induit une diminution de la phosphorylation Ser473 ; quant à la phosphorylation Thr308, celle-ci est moins affectée (Maira, Galetic et al. 2001).

Il existe de nombreuses autres molécules se liant et régulant l'activité d'Akt, aussi Akt peut s'oligomériser au travers de liaisons intramoléculaires, ce qui pourrait permettre une activation croisée.

**d) Régulation de la survie cellulaire par la protéine kinase Akt**

Depuis quelques années, beaucoup d'articles ont montrés des dérégulations de la voie de signalisation d'Akt dans certains cancers (Altomare and Testa 2005). L'activation de la voie Akt envoie un signal de survie permettant aux cellules de résister à l'apoptose. L'augmentation de l'activité d'Akt peut venir de l'amplification des gènes codant pour Akt (Cheng, Godwin et al. 1992), de mutations dans la voie de signalisation PI3K que ce soit au niveau de son régulateur négatif PTEN ou au niveau des sous-unités catalytiques ou régulatrices de la PI3K. La protéine Akt est d'ailleurs devenue une cible très attractive pour un traitement anticancéreux. Une meilleure connaissance des mécanismes régulant cette protéine pourrait permettre d'établir des traitements ne ciblant que son effet pro oncogénique.

Akt a des effets directs sur l'inhibition de l'apoptose en ciblant différentes protéines comme BAD, FKHR ou bien encore P53 (voir Figure 15). J'ai établi une liste des protéines régulées par Akt qui peuvent être responsables de la survie cellulaire induite par Akt.

**(1) BAD**

BAD est un membre de la famille Bcl-2, elle se lie à Bcl-2 ou Bcl-X, ce qui inhibe leur effet anti-apoptotique. Akt active va phosphoryler BAD sur sa serine 136 et ceci inhibe son activité pro-apoptotique. Une fois phosphorylée, BAD n'est plus complexée avec Bcl-2 ou Bcl-X.

**(2) Caspase-9**

La Caspase-9 est un initiateur et un « exécuter » de l'apoptose. Il a été montré qu'Akt phosphoryle la caspase-9 sur la serine 196, et que cette phosphorylation induit une baisse de l'activité de la caspase (Cardone, Roy et al. 1998).

**(3) FoxO Forkhead**

Les facteurs de transcription de la famille Forkhead forment une famille de 4 protéines FoxO1/FKHR, FoxO2, FoxO3/FKHRL1 et FoxO4/AFX. Ces protéines sont directement phosphorylées par Akt. Les cibles de ces facteurs de transcription sont des gènes impliqués dans l'inhibition de la survie cellulaire. Parmi ces gènes on trouve le ligand de Fas, TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand) et TRADD (TNF receptor type 1 associated death domain), Bim et Bcl-6 (Greer and Brunet 2005). Une fois phosphorylés, les facteurs de transcription FoxO sont exclus du noyau, bloquant ainsi la transcription des gènes pro-apoptotiques.

**(4) NF- $\kappa$ B**

Le facteur de transcription NF- $\kappa$ B (Nuclear Factor  $\kappa$ B) est régulé par Akt, une dérégulation de son activité est source de développement de certains cancers. NF- $\kappa$ B est complexé avec I $\kappa$ B ce qui maintient NF- $\kappa$ B inactif. Cette inhibition est levée par phosphorylation d'I $\kappa$ B par IKK (I $\kappa$ B Kinase). Akt active IKK par phosphorylation, ce qui conduit à la dégradation d'I $\kappa$ B, puis à la translocation de NF- $\kappa$ B dans le noyau où ce dernier va activer la transcription des gènes de survie.

**(5) JNK**

L'inhibition du rôle pro-apoptotique de la voie JNK par Akt, se fait au travers de la séquestration de JIP1 élément nécessaire à l'activation de cette voie.

**(6) Mdm2**

Mdm2 pour «Murine double minute 2» est une ubiquitine ligase, l'une de ses cibles est la protéine P53 qui est un régulateur majeur de la mort cellulaire en réponse au stress (dommage au niveau de l'ADN en particulier). Mdm2 a deux sites de phosphorylation Ser166 et Ser186 qui sont phosphorylés par Akt ce qui entraîne une relocalisation nucléaire de Mdm2 et une augmentation de son activité ubiquitine ligase. Mdm2 va alors induire la dégradation de P53 et donc stimuler la survie cellulaire.

**(7) CREB**

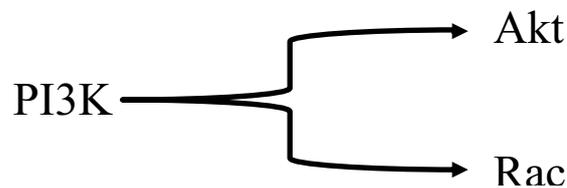
La protéine Cyclic AMP (cAMP)-response element binding protein (CREB) est un facteur de transcription phosphorylé par Akt sur la serine 133. Cette phosphorylation augmente l'activité de CREB induisant une augmentation de la transcription de gènes anti-apoptotiques.

**e) Akt et Adhérence**

La protéine Akt est impliquée dans la régulation de l'adhérence ou plutôt de la survie médiée par l'adhérence de la cellule à la MEC. L'adhérence conduit à l'activation des intégrines et à leurs voies de signalisation associées permettant l'activation d'Akt (Cordes, Seidler et al. 2006). ILK est d'ailleurs présumée comme étant une des PDK2 (enzyme phosphorylant la Ser473 d'Akt). Il a été montré que suite à l'adhérence des cellules épithéliales à la MEC, il se crée des domaines riches en PIP3 au niveau membranaire suivi d'une relocalisation de la protéine Akt dans ces domaines. L'adhérence à la MEC permet par ailleurs une protection contre l'apoptose (Watton and Downward 1999).

**f) PI3K, Rac et Akt**

Dans de nombreux types cellulaires, la liaison d'un facteur de croissance tel que le PDGF sur son récepteur induit l'activation de la PI3K. En aval de la PI3K, les PIP3 nouvellement synthétisés vont d'une part induire l'activation de la protéine Akt et d'autre part l'activation de la GTPase Rac. Ces activations se font par des voies de signalisation distinctes et indépendantes (Welch, Eguinoa et al. 1998).



Les voies Rac et Akt, deux voies de signalisation pas totalement indépendantes.

La petite GTPase Rac a été montrée comme étant une cible de la protéine Akt (Kwon, Kwon et al. 2000; Zhang, Wang et al. 2006). La GTPase Rac est phosphorylée sur la serine 71 par Akt. La phosphorylation de Rac diminue la capacité de Rac à se lier au GTP inhibant ainsi la GTPase.

Notre recherche a démontré un nouveau mécanisme de régulation de la protéine Akt, mettant en jeu la GTPase Rac. L'activation des lymphocytes T après stimulation du récepteur à l'antigène induit l'activation rapide de la protéine Akt, cette activation fait intervenir la GTPase Rac en amont d'Akt (Genot, Arrieumerlou et al. 2000).   la suite de ces travaux, d'autres équipes ont pu mettre en évidence que Rac (ou même Cdc42) pouvait agir en amont d'Akt afin de stimuler son activité (Coniglio, Jou et al. 2001; Zugasti, Rul et al. 2001).

### Introduction bibliographique

L'activation d'Akt par Rac a par ailleurs été corrélée avec une protection contre l'anoïkis dans des cellules épithéliales et fibroblastiques (Coniglio, Jou et al. 2001; Zugasti, Rul et al. 2001). Lors de l'activation d'Akt par Rac nous montrons que l'activité PI3K est requise (Genot, Arrieumerlou et al. 2000).

## **B. Introduction du sujet**

Il est communément admis que la protéine Akt va être activée en réponse à l'activation de la PI3K. Dans la plupart des types cellulaires testés, la PI3K activée va d'une part induire l'activation de la protéine Akt et d'autre part l'activation de Rac.

### **Mise en évidence d'une nouvelle voie de régulation de la protéine Akt**

*(The T-cell receptor regulates Akt (protein kinase B) via a pathway involving Rac1 and phosphatidylinositide 3-kinase)*

- Rac active Akt :

Notre recherche a démontré l'existence d'un nouveau mécanisme de régulation de la protéine Akt qui met en jeu la GTPase Rac. L'activation des lymphocytes T suite à la stimulation du récepteur pour l'antigène est accompagnée d'une activation rapide de la protéine Akt (Genot, Arrieumerlou et al. 2000). L'activation d'Akt dans les lymphocytes T fait intervenir la GTPase Rac en amont de la cascade. En effet, dans ces cellules, l'expression de la GTPase V12Rac (forme mutée constitutivement active de Rac) entraîne l'activation de la protéine kinase Akt. Inversement, l'expression d'une protéine mutante à caractère dominant négatif (N17Rac) bloque l'activation de cette kinase en réponse à la stimulation des lymphocytes T.

Nous avons ainsi mis en évidence une nouvelle voie de signalisation conduisant à l'activation de la protéine Akt (Genot, Arrieumerlou et al. 2000).

- L'activation d'Akt par Rac est dépendante de l'activité PI3K :

Lors de ces travaux, il a été mis en évidence que l'activation d'Akt par Rac était dépendante de l'activité de la PI3K. En effet, après ajout d'un inhibiteur de la PI3K, V12Rac devient incapable d'activer Akt.

Pour plus de commodités, j'ai décidé d'annoter cette nouvelle voie d'activation d'Akt : voie « R-P-A » pour « Rac-PI3K-Akt ».

## Introduction du sujet

Le but de cette thèse a été de rechercher les mécanismes mis en jeu dans cette voie « R-P-A ». Sachant que P85 a la capacité de lier la GTPase Rac et que l'activation d'Akt par Rac est dépendante de la PI3K, nous avons supposé que la sous-unité régulatrice P85 pouvait jouer un rôle important dans l'activation d'Akt par Rac. Je me suis donc plus particulièrement intéressé à la signalisation au niveau moléculaire entre les 3 protéines que sont Rac, Akt et la PI3K. Cette partie du travail est détaillée dans les trois premières parties.

La quatrième partie correspond à l'étude de la PI3K et son rôle dans la formation de structures d'adhérences : les podosomes.

## **C. Matériel et Méthodes**

### **1. Matériel biologique**

#### **a) Souches bactériennes**

Les souches d'*Escherichia Coli* utilisées dans ce travail sont :

- **DH5 $\alpha$**  (supE44,  $\Delta$ lacU169( $\Phi$ 80lacZ $\Delta$ M15) hsdR17, recA1, endA1, gyrA96, thl1, relA1),
- **BL21** (E. coli B F<sup>-</sup>, dcm, ompT, hsdS(rB<sup>-</sup>mB<sup>-</sup>), gal),
- **JM110** (dam, dcm, supE44, hsdR17, thi leu rpsL lacY galK galT ara tonA thr tsx  $\Delta$ (lac-proAB) F'[traD36 proAB<sup>+</sup> lacI<sup>q</sup> lacZ $\Delta$ M15] ).

#### **b) Lignées cellulaires**

Les lignées cellulaires utilisées lors de ce travail sont :

- **Lignée lymphocytaire B A20**: Cette lignée provient de cellules B lymphoïdes d'origine murine,
- **Lignée lymphocytaire T Jurkat** : les cellules JHM1 sont une sous-lignée issue d'une lignée leucémique de cellules T humaines,
- **Lignée endothéliale aortique PAE** : cellules endothéliales d'aortes de porc établies en lignée. Nous disposons au laboratoire des lignées : PAE Wild Type, PAE V12Rac et PAE V12Cdc42, ces deux dernières lignées vont exprimées respectivement, en réponse à l'IPTG, le transgène V12Rac et V12Cdc42.

### **2. Matériel**

#### **a) Plasmides**

Les plasmides utilisés pour ce travail sont listés dans la Figure 18. Cette figure réunit les plasmides déjà présents au laboratoire ainsi que ceux que j'ai pu construire durant ma thèse.

## Matériel et Méthodes

<b>G1</b>	P85β pT7T319U	Amp	JM110	<b>G39</b>	pEGFP-C1 - GFP-P85α entier	Kana	DH5α Mutations
<b>G2</b>	P85β pT7T319U	Amp	CM33	<b>G40</b>	pEGFP-C1 - GFP-P85αΔBH	Kana	DH5α OK, pas de mutations
<b>G3</b>	pE GFP BHα	Kana	DH5α	<b>G41</b>	pEGFP-C1 - GFP-P85α entier	Kana	DH5α mutations mais même a.a.
<b>G4</b>	pEF empty	Amp	DH5α	<b>G42</b>	pGEX 2T-GST-P85β	Amp	BL21 OK, pas de mutations
<b>G5</b>	pE GFP Cadre de lecture 2	Kana	DH5α	<b>G43</b>	pGEX 2T-GST-P85αΔBH	Amp	BL21 OK, pas de mutations
<b>G6</b>	pRK5 Myc-L61RAC	Amp	DH5α	<b>G44</b>	P85β pT7T319U	Amp	DH5α
<b>G7</b>	pSOS HA-PKH	Amp	DH5α	<b>G45</b>	pGEX 2T-GST-V12cdc42	Amp	HL21
<b>G8</b>	GST-P85α	Amp	?	<b>G46</b>	pGEX 1AT-GST-V12Rac	Amp	BL21
<b>G9</b>	GST-L61Rac	Amp	?	<b>G47</b>	pGEX 2T-GST-Cdc42(WT)	Amp	BL21
<b>G10</b>	GST-P85β	Amp	?	<b>G48</b>	pGEX 2T-GST-L61Cdc42	Amp	BL21
<b>G11</b>	PAK GST CRIB	Amp	BL21	<b>G49</b>	pGEX 2T-GST-L61(S37A)Cdc42	Amp	BL21
<b>G12</b>	GST seule	Amp	BL21	<b>G50</b>	pGEX 2T-GST-L61(Y40C)Cdc42	Amp	BL21
<b>G13</b>	pEF BOS Bha clone 1	Amp	DH5α	<b>G51</b>	pGEX 2T-GST-N17Cdc42	Amp	BL21
<b>G14</b>	pEF BOS Bbb clone 4	Amp	DH5α	<b>G52</b>	pGEX 2T-GST-Cdc42(W1)-Myc	Amp	HL21
<b>G15</b>	pEF BOS empty	Amp	DH5α	<b>G53</b>	pGEX 2T-GST-V12Cdc42-Myc	Amp	BL21
<b>G16</b>	SRα-P85α	Amp	DH5α	<b>G54</b>	pGEX 2T-empty	Amp	HL21
<b>G17</b>	SRα-P85αΔ	Amp	DH5α	<b>G55</b>	pRK5 empty E. Caron	Amp	DH5α
<b>G18</b>	pCDNA3-P85α-CFP	Amp	DH5α	<b>G56</b>	pEGFP-BH beta	Kana	DH5α
<b>G19</b>	pCMV6-P85α flag	Amp	DH5α	<b>G57</b>	pRK5-Myc-P85α Full Length bovin	Amp	DH5α
<b>G20</b>	pMT 2 P85α	Amp	DH5α	<b>G58</b>	pRK5 HA-P85α Full Length bovin(19)	Amp	DH5α
<b>G21</b>	pCDNA3-P85β	Amp	DH5α	<b>G59</b>	pRK5 HA-P85α delta BH bovin	Amp	DH5α
<b>G22</b>	pBLUESCRIPT P85α ΔBH	Amp	DH5α	<b>G60</b>	pRK5 HA-BH alpha mouse	Amp	DH5α
<b>G23</b>	C21 GST	Amp	HL21	<b>G61</b>	pRK5 HA-BH1 beta mouse	Amp	DH5α
<b>G24</b>	pT7T319U P85β delta BH	Amp	DH5α	<b>G62</b>	pT7T319U P85β sans mutations	Amp	DH5α
<b>G25</b>	pEGFP C1	Kana	DH5α	<b>G63</b>	pRK5-HA-P85 beta mouse	Amp	DH5α
<b>G26</b>	pGEX 2T	Amp	BL21	<b>G64</b>	pEF-BOS-C2-P110 (constitutif actif)	Amp	DH5α
<b>G27</b>	pEGFP C1	Kana	DH5α	<b>G65</b>	P110 K277R (constitutif actif)	Amp	DH5α
<b>G28</b>	pRK5 Myc-empty a confirmer!!	Amp	DH5α	<b>G66</b>	pRK5-HA-P85βΔBH	Amp	DH5α
<b>G29</b>	pGEX 2T-GST BHα	Amp	DH5α mutations mais même a.a.	<b>G67</b>	P110 WT	Amp	DH5α
<b>G30</b>	pGEX 2T-GST-DHβ	Amp	DH5α mutations mais même a.a.	<b>G68</b>	pRK5 Myc-L61RAC	Amp	JM110
<b>G31</b>	pGEX 2T-GST BHα	Amp	BL21 mutations mais même a.a.	<b>G69</b>	pRK5 Myc-L61RAC	Amp	DH5α
<b>G32</b>	pGEX 2T-GST-DHβ	Amp	HL21 mutations mais même a.a.	<b>G70</b>	pGEX 2T-GST-NEW BHalpha	Amp	DH5α
<b>G33</b>	pGEX 2T-GST-P85α entier	Amp	DH5α mutations mais même a.a.	<b>G71</b>	pGEX 2T-GST-NEW BHbeta	Amp	DH5α
<b>G34</b>	pGEX 2T-GST-P85αRH	Amp	DH5α OK, pas de mutations	<b>G72</b>	pGEX 2T-GST-NEW BHalpha	Amp	HL21
<b>G35</b>	pGEX 2T-GST-P85α entier	Amp	BL21 mutations mais même a.a.	<b>G73</b>	pGEX 2T-GST-NEW BHbeta	Amp	BL21
<b>G36</b>	pGEX 2T-GST-P85αΔBH	Amp	BL21 OK, pas de mutations	<b>G74</b>	pRK5-HA-NEW BHalpha	Amp	DH5α
<b>G37</b>	pGEX 2T-GST-P85β	Amp	DH5α OK, pas de mutations	<b>G75</b>	pRK5-HA-NEW BHbeta	Amp	DH5α
<b>G38</b>	pGEX 2T-GST-P85αΔBH	Amp	DH5α OK, pas de mutations	<b>G76</b>	GFP-ACTIN	Amp	DH5α

Figure 18 Récapitulatif des constructions utilisées pour cette étude.

NB : Au laboratoire, nous disposons déjà de deux constructions correspondants au domaine BH isolé à différencier des « new »BH que j'ai réalisé par la suite. Voici la description de ces domaines BH d'origine murine: le domaine BHα issu de P85α correspond aux acides nucléiques 496 à 891 (acides aminés : 166 à 297) ; le domaine BHβ issu de P85β correspond aux acides nucléiques 367 à 771 (acides aminés: 123 à 257). Ces domaines ont été clonés dans le vecteur pEGFP-C2 par les enzymes de restrictions EcoRI et BamHI.

### b) Anticorps

*Anticorps primaires:*

**Anti Rac1:** clone 23A8, Upstate; dilution Western-Blot: 1/1000.

**Anti Phospho-Akt (Thr308):** #9275, Cell Signaling Technology (CST); WB: 1/500; IF: 1/50

**Anti Phospho-Akt (Thr473):** #9271, CST; WB: 1/500; IF: 1/50

**Anti Akt:** #9272, CST; WB: 1/500.

**Anti α-tubulin:** clone DM 1A, SIGMA; WB: 1/10000.

**Anti PI3 Kinase P110α:** #4254, CST; WB: 1/1000; IF: 1/100.

**Anti Phospho-p38 MAP Kinase (Thr180/Tyr182):** #9211, CST; WB: 1/1000.

**Anti Phospho-GSK3β (Ser9):** #9336, CST; WB: 1/1000.

**Anti Akt:** #559028, BD Biosciences; WB: 1/1000.

## Matériel et Méthodes

**Anti Phosphotyrosine PY-Plus:** Zymed; WB: 1/1500.

**Anti PI3 Kinase P110 $\alpha$ :** clone H-201, #sc-7174, Santa Cruz; WB: 1/1000; IF: 1/100.

**Anti PI3 Kinase P85:** WB: 1/500; IF: 1/50 Upstate.

**Anti PI3 Kinase P85 $\alpha$ :** clone U5, WB: 1/500; IF: 1/50; ICRF.

**Anti PI3 Kinase P85 $\beta$ :** clone T15, #MCA1170G, Serotec; WB: 1/500; IF: 1/50.

**Anti Vinculine:** clone hVIN-1, Sigma; dilution immunofluorescence: 1/300.

**Anti SHIP:** Upstate Biotech; dilution Western-Blot: 1/500.

**Anti PTEN:** Santa cruz; dilution Western-Blot: 1/1000.

**Anti Cdc42:** clone 44 BD Transduction laboratories; dilution Western-Blot: 1/250.

**Anti HA:** clone 12C5A, dilution IF: 1/250.

**Anti GFP:** clone 7.1&13.1 Boehringer, dilution Western-Blot: 1/1000.

### Anticorps secondaires (western-blot) :

Ac polyclonal de chèvre anti-IgG de lapin conjugué à la « Horse Radish Peroxydase » (HRP) (DAKO, P0448, 1/2000<sup>e</sup>)

Ac polyclonal de lapin anti-IgG de souris conjugué à la HRP (DAKO, P0260, 1/5000<sup>e</sup>).

### **c) Produits chimiques**

Ly 294002, C<sub>19</sub>H<sub>17</sub>NO<sub>3</sub>, Sigma L9908. Utilisé à 20 $\mu$ M ajouté dans le milieu de culture des cellules.

### **3. Méthodes**

#### **a) Milieux et conditions de cultures**

##### ***(1) Culture bactérienne***

Les bactéries sont cultivées à 37°C en milieu complet LB Broth (10g de bactotryptone, 5g d'extraits de levure et 5g de NaCL pour 1 litre d'eau). Un autre milieu le TB pour « Terrific Broth » a été utilisé pour ce travail (préparation des « maxi-prep » en chlorure de césium).

Les milieux de culture sont stérilisés par autoclavage à 120°C pendant 20 minutes. Les milieux solides sont obtenus par addition de 15g/L d'agar avant autoclavage.

##### ***(2) Culture des cellules A20***

Les cellules A20 sont cultivées dans le milieu RPMI supplémenté par 10% de sérum de veau fœtal « décomplémenté » (56°C pendant 30 minutes), 2 mM de L-glutamine, 0.05 mM de  $\beta$ -mercaptoethanol et enfin par des antibiotiques (Pénicilline 100UI/L et Streptomycine 100 $\mu$ g/L). La culture est faite dans un incubateur à 37°C, 5% CO<sub>2</sub> en atmosphère humide.

Les cultures sont démarrées avec environ 10<sup>5</sup> cellules/ml et sont maintenues ensuite à environ 10<sup>6</sup> cellules/ml. La culture est maintenue soit par ajout, soit par changement de milieu ; ce dernier est entièrement renouvelé une fois par semaine. Les cellules A20 ont la capacité d'être à la fois adhérentes et non adhérentes ; à chaque changement de milieu les deux populations sont conservées. La population de cellules adhérentes est récoltée par tapotements avec la main sur la boîte de culture et par pipetages successifs.

Les cellules A20 sont congelées dans leur milieu de culture avec 5% de DMSO, à raison de 10<sup>6</sup> cellules/ml.

##### ***(3) Culture des cellules Jurkat***

La lignée lymphocytaire T Jurkat est une lignée cellulaire dont les cellules poussent en suspension. La culture a été entretenue dans du milieu RPMI 1640 supplémenté par 10% de sérum de veau fœtal « décomplémenté », 2 mM de L-glutamine et enfin par des antibiotiques (Pénicilline 100UI/L et Streptomycine 100 $\mu$ g/L). La culture est faite dans un incubateur à 37°C, 5% CO<sub>2</sub> en atmosphère humide.

La culture pour les cellules Jurkat est identique à celle pour les cellules A20.

#### **(4) Culture des cellules PAE**

Les cellules PAE sont cultivées en milieu F12-HAM, supplémenté par 10% de sérum de veau foetal « décomplémenté » 2 mM de L-glutamine et enfin par des antibiotiques (Pénicilline 100UI/L et Streptomycine 100µg/L, en complément, l'Hygromycine B 100 µM et la Puromycine 500mM sont ajoutés pour les lignées PAE V12Rac et PAE V12Cdc42).

L'expression des transgènes est induite par ajout de 0.1mM d'IPTG dans le milieu de culture.

#### **b) Techniques de biologie moléculaire**

##### **(1) Colony Cracking**

La technique du cracking permet de sélectionner des candidats positifs à un clonage. En effet, par cette méthode, on va pouvoir détecter les plasmides qui contiennent un insert. Cette technique est rapide car il n'y a pas besoin de réaliser des « mini-prep », ni de faire un screening par digestions enzymatique.

Suite à un clonage, les clones bactériens sont remis à pousser une nuit sur boîte de pétrie sous forme de patch de 2-3 cm environ. Une petite quantité de bactéries provenant du patch est transférée dans un tube contenant 20 µl d'une solution de cracking (20 mM NaOH, 0.5% SDS, 5 mM EDTA). Le tube est mit à incuber à 55°C pendant 30 minutes puis vortexé pendant 1 minute (afin de casser l'ADN génomique en fragments de 20 à 30 kb). Du tampon de charge est rajouté juste avant le dépôt pour migration. Les clones éventuellement positifs sont détectés, suite à l'électrophorèse, par un décalage de migration par rapport à un contrôle (plasmide sans insert).

##### **(2) Mutagénèse dirigée**

La mutagénèse dirigée a été réalisée avec le kit provenant de chez Stratagene QuikChange® Multi Site Directed Mutagenesis Kit. La technique consiste à amplifier le plasmide contenant le gène à muter par PCR. Cette amplification est réalisée sur les deux brins à partir d'amorces qui portent la mutation désirée. Dès lors, on a deux sources de plasmides : une de plasmides mutés néo-synthétisés et une de plasmides sauvages issus de la bactérie d'origine. Les plasmides d'origine vont être spécifiquement dégradés par une enzyme de restriction BclI car celle-ci ne reconnaît son site de restriction que s'il est méthylé.

##### **(3) Séquençages**

Les séquençages d'ADN plasmidique ont été réalisés par l'entreprise MWG Biotech (Ebersberg, Allemagne).

#### **(4) Electrophorèse en gels d'agarose**

L'électrophorèse de l'ADN a été réalisée sur gels d'agarose 0.8% (parfois 2% pour les fragments d'ADN de petite taille) sous une tension de 80V. Le tampon de migration utilisé est le TAE (0.8 M Tris-acetate, 20 mM EDTA). La migration est suivie grâce à une solution de dépôt (6x : 0.25% bleue de Bromophénol, 0.25% xylène-cyanol, 30% glycérol). Un marqueur de poids moléculaire allant de 10 kb à 0.5 kb (« 1 kb DNA ladder » de marque New England BioLabs) a été déposé afin d'estimer la taille des fragments d'ADN. Après migration, les fragments d'ADN sont observés sous UV grâce au Bromure d'ethidium préalablement inclus dans le gel d'agarose à raison de 0.5 µg/ml.

Pour estimer la taille des petits fragments d'ADN, nous avons utilisé préférentiellement un marqueur « 100 bp DNA ladder » (New England BioLabs).

#### **(5) Purification d'ADN**

Pour purifier l'ADN plasmidique plusieurs protocoles ont été utilisés.

Les « Mini-Prep » :

- « Mini-Prep » classique : le protocole de purification est celui décrit par Sambrook et coll (1989).
- « Mini-Prep » pour séquençage : Pour les préparations d'ADN plasmidique destinées à être séquencées, nous avons du utiliser un kit de purification pour obtenir une pureté supérieure à celle obtenue avec le protocole de « Mini-Prep » classique. Le kit utilisé est de marque Promega (Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System)

Les « Maxi-Prep » :

- « Maxi-Prep » chlorure de Césium : les purifications d'ADN en grandes quantités par la méthode du gradient de chlorure de césium ont été réalisées selon le protocole décrit par Sambrook et coll (1989). Cette « maxi-prep » est réalisée à partir d'une culture sur la nuit dans 500 ml de Terrific Broth (TB).
- « Maxi-Prep » Qiagen : Alternative aux « maxi-prep » chlorure de césium. QIAGEN, Plasmid Maxi Kit.

Pour purifier les fragments d'ADN issus de digestions enzymatiques ou de PCR, nous avons utilisé le kit « GFX PCR DNA and GEL Band Purification Kit » de l'entreprise Amersham.

#### **(6) Transformations**

Les transformations des bactéries sont effectuées selon le protocole décrit par Chung et coll (1988)

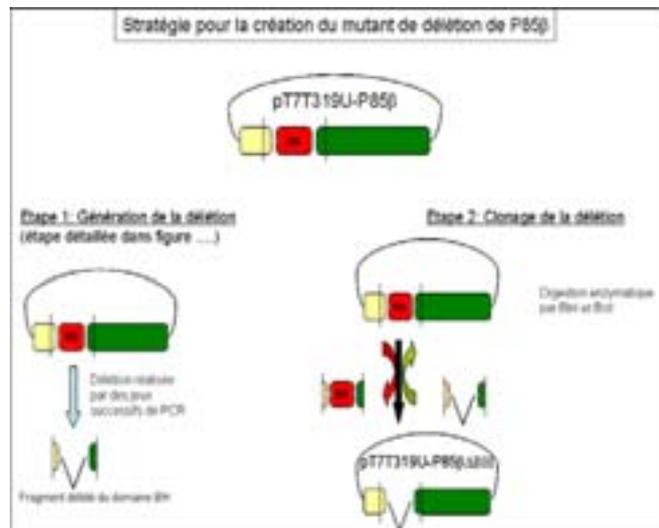
**(7) Réalisation des mutants P85.**

**(a) Elaboration du mutant P85 $\beta$  $\Delta$ BH**

Dans ce mutant de délétion : P85 $\beta$  $\Delta$ BH, nous avons délété la région correspondant au nucléotide 364 jusqu'au nucléotide 768 (acides aminés : 122 – 256). Le plasmide d'origine à partir duquel j'ai réalisé le mutant de délétion de P85 $\beta$  nous a été donné par le Docteur Johannes W.G. Janssen (Institute of Human Genetics, Heidelberg, Allemagne). L'ADN complémentaire (ADNc) de P85 $\beta$  murin a été cloné dans le vecteur T7T319U (G1, G2 et G44).

Principe de la technique :

Le principe de la méthode utilisée pour réaliser la délétion est schématisé dans la Figure 19. Cette méthode est réalisée en deux étapes : la première a consisté à générer un fragment contenant la délétion et la deuxième étape était une étape de clonage visant à remplacer le fragment non délété par le fragment portant la délétion.



**Figure 19 : Schéma descriptif de la technique adoptée pour réaliser le mutant de délétion : P85 $\beta$  $\Delta$ BH.**

- *1<sup>ère</sup> étape : Génération d'un fragment contenant la délétion*

J'ai fait une PCR de part et d'autre du domaine BH que je souhaitais délérer. L'une de deux PCR, celle en position 3' du domaine BH, a été faite avec une amorce qui portait une séquence complémentaire à la séquence amplifiée par la PCR en 5' du domaine BH.

La PCR en 5' du domaine BH a été réalisée à l'aide des amorces « 2214 » et « 2215 », la PCR en 3' a été faite avec les amorces « 2217 » et « 2224 ». L'amorce « 2214 » est celle qui porte la séquence complémentaire et qui doit permettre l'hybridation entre les fragments «5'» et «3'».

Les brins complémentaires des deux fragments «5'» et «3'» qui doivent s'hybrider vont être amplifié par PCR avec les amorces « 2214 » et « 2224 » (voir Figure 19).

## Matériel et Méthodes

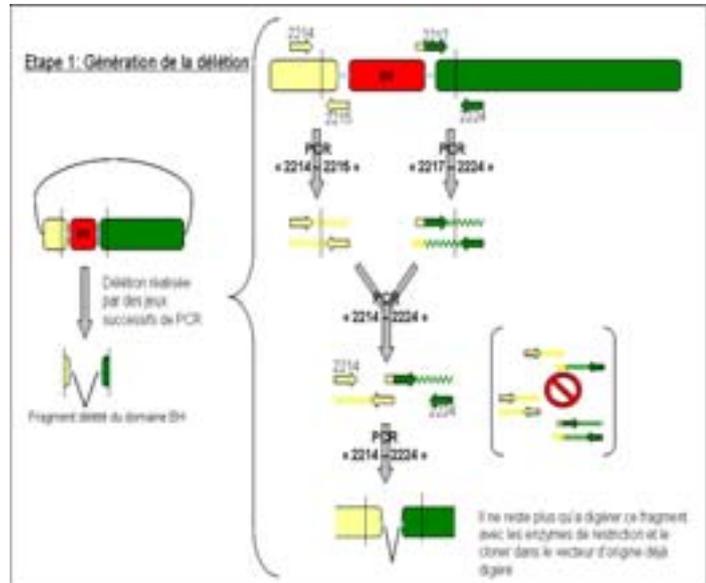
La PCR issue du fragment «5'» et du fragment «3'» a bien généré un produit d'amplification correspondant à un fragment où le domaine BH est absent.

- 2<sup>ème</sup> étape : Clonage du fragment contenant la délétion :

Une fois ce fragment obtenu, il ne me restait plus qu'à le mettre en lieu et place du fragment homologue mais non délété, du domaine BH. Pour faire ce « clonage », j'ai choisi les enzymes de restriction BlnI et BclI.

L'enzyme BclI est une enzyme qui ne va cliver son site de restriction que si celui n'est pas modifié par méthylation, or les

bactéries DH5 $\alpha$  contiennent les méthylases permettant ces modifications. Avant toutes choses, j'ai du transformer le plasmide T7T319U-P85 $\beta$  dans des souches d'*E.coli* déficientes en méthylases : JM110 et GM33. Le plasmide purifié à partir de l'une de ces souches a été digéré par BlnI et BclI, puis j'ai cloné le fragment délété du domaine BH dans ce vecteur.



**Figure 20 : Schéma décrivant la première étape de réalisation du mutant P85 $\beta$  $\Delta$ BH.**

Suite au séquençage de la zone couvrant la délétion, j'ai confirmé que la délétion du domaine BH était bien réalisée. J'ai ainsi obtenu la construction T7T319U-P85 $\beta$  $\Delta$ BH (stock G24).

### **(b) Réalisation de mutants des isoformes P85 étiquetés GST**

- (i) Réalisation des constructions : pGEX2T-P85 $\alpha$ , pGEX2T-P85 $\alpha$  $\Delta$ BH, pGEX2T-BH $\alpha$  et pGEX2T-BH $\beta$

Pour réaliser les constructions étiquetées avec la Glutathione S-Transférase (GST), j'ai utilisé le plasmide pGEX2T. Le principe du clonage est identique pour toutes les constructions. Dans un premier temps, je fais une PCR avec des amorces qui me permettent d'ajouter les sites de restriction reconnus par BamH1 et EcoR1. Ensuite, les fragments de PCR ont été clonés dans le plasmide pGEX2T préalablement digéré par BamH1 et EcoR1.

## Matériel et Méthodes

Les couples d'amorces utilisés pour les réactions de PCR sont (P1, P2) ; (P1, P2) ; (P3, P4) ; (P7, P8) ; (P7, P8) et (P5, P6) respectivement pour P85 $\alpha$  ; P85 $\alpha$  $\Delta$ BH ; BH $\alpha$  ; P85 $\beta$  ; P85 $\beta$  $\Delta$ BH et BH $\beta$ .

*Remarque : le clonage pour les constructions GST-P85 $\beta$  et GST-P85 $\beta$  $\Delta$ BH varie légèrement des autres du fait que j'ai du faire une digestion partielle des fragments de PCR. En effet, l'ADNc de P85 $\beta$  contient un site de restriction BamHI interne.*

Les clones positifs ont dans un premier temps été sélectionnés au travers d'un crible par «Colony Cracking », puis confirmés par analyse de leur profil de restriction et enfin envoyés à séquencer.

Le vecteur pGEX2T-P85 $\alpha$  $\Delta$ BH (G34, G36) ne contient aucune mutation. Les vecteurs pGEX2T-P85 $\alpha$  (G33, G35) ; pGEX2T-BH $\alpha$  (G29, G31) ; et pGEX2T-BH $\beta$  (G30, G32) contiennent des mutations au niveau nucléotidique mais qui sont sans conséquence au niveau des acides aminés.

### (ii) Correction de la mutation dans la construction T7T319U-P85 $\beta$

Les vecteurs pGEX2T-P85 $\beta$  et pGEX2T-P85 $\beta$  $\Delta$ BH portent tous deux une mutation en position 1674 (A>T) (la position réfère à l'ADNc de P85 $\beta$  non délété). Cette mutation a été retrouvée sur tous les clones séquencés, ceci veut donc dire que la mutation était déjà présente dans le plasmide d'origine T7T319U-P85 $\beta$  envoyé par Le D<sup>r</sup> Johannes W.G. Janssen. Pour résoudre ce problème, le D<sup>r</sup> Janssen nous a envoyé d'autres vecteurs « P85 $\beta$  » mais d'après leur séquençage, leur insert était soit incomplet soit muté.

En fin de compte, pour me débarrasser de la mutation A1674T, j'ai utilisé la méthode de mutagenèse dirigée (cf. Matériel et Méthodes). La mutagenèse dirigée a été faite sur le plasmide T7T319U-P85 $\beta$  (G44, muté) et suite à cela, j'ai pu obtenir un nouveau plasmide ne contenant plus la mutation A1674T.

Ce plasmide T7T319U-P85 $\beta$  non muté est stocké sous le nom G62. La construction a été vérifiée dans son intégralité et ne comporte plus aucune mutation.

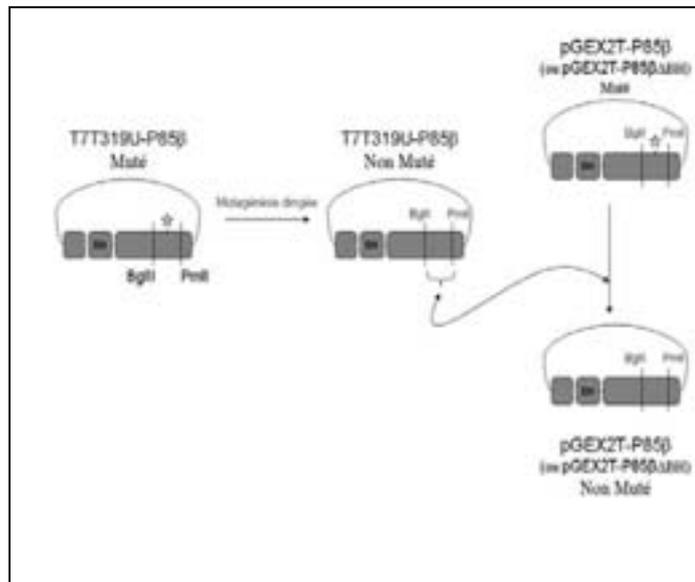
### (iii) Correction de la mutation dans les constructions pGEX2T-P85 $\beta$ et pGEX2T-P85 $\beta$ $\Delta$ BH

Par la suite, il m'a fallu corriger la mutation A1674T présente dans les plasmides pGEX2T. Au lieu de refaire toute les étapes de PCR à partir du plasmide P85 $\beta$  (G62) non muté, j'ai

## Matériel et Méthodes

préférée échanger le fragment muté sur les plasmides pGEX2T par le fragment non muté du plasmide G62 (voir Figure 21).

Pour faire cela, j'ai choisi les enzymes BglII et PmlI qui bordent le site portant la mutation, ainsi par simple clonage, j'ai pu remplacer le fragment muté par celui ne l'étant pas. J'ai ainsi obtenu les vecteurs pGEX2T-P85 $\beta$  (G37 et G42) et pGEX2T-P85 $\beta$  $\Delta$ BH (G38 et G43). Ces vecteurs ont été vérifiés par séquençage et effectivement, ils ne portent plus la mutation A1674T.



**Figure 21 Correction de la mutation A1674T de l'ADNc de P85 $\beta$ .** Correction réalisée par mutagenèse dirigée avec le kit *Stratagene QuikChange® Multi Site Directed Mutagenesis Kit*.

### (c) Réalisation des constructions « nouveaux » BH

Après une analyse extensive de la littérature concernant le domaine BH de P85, et malgré une forte divergence de taille, j'ai pu me faire une idée précise de la région correspondant à ce domaine. J'ai rapporté les différents domaines BH trouvés dans la littérature, ainsi pour des constructions de type BH isolé on trouve des régions couvrant les acides aminés 71-339 (Zheng, Bagrodia et al. 1994) ; 78-320 (Bokoch, Vlahos et al. 1996), 110-301 (Musacchio, Cantley et al. 1996), 104-302 (Harpur, Layton et al. 1999) ; pour les mutants de délétions du domaine BH, les régions délétées correspondent aux acides aminés : 84-313 (Chamberlain, Berry et al. 2004), 144-299 (Hill, Huang et al. 2001; Kang, Schneider et al. 2002), 134-302 (Harpur, Layton et al. 1999), 119-256 (Beeton, Chance et al. 2000).

L'erreur pour la désignation des régions des anciens BH vient, je pense, d'un alignement avec un mutant de délétion. Dans ces mutants de délétion, même si la perte du domaine BH n'est pas totale, on peut aisément imaginer que si une majeure partie de ce domaine est retirée alors ce domaine ne sera plus fonctionnel. Les auteurs ont donc désigné cette région comme étant le

## Matériel et Méthodes

domaine BH, mais si on prend cette région isolée comme étant le domaine BH, on n'aura pas de domaine BH fonctionnel.

Après m'être rendu compte que les anciens BH ne pouvaient être fonctionnels car tronqués dans leur partie N-terminale, j'ai décidé de refaire toutes les constructions pour les domaines BH en choisissant des amorces qui couvriraient une zone étendue. Le choix des amorces pour le domaine BH de P85 $\alpha$  a été fait à partir d'une publication (Musacchio, Cantley et al. 1996) dans laquelle les auteurs ont résolu la structure du domaine BH de P85 $\alpha$ . Les auteurs de cette publication définissent la région comprise entre les acides aminés 110 et 302 comme le domaine BH. J'ai donc conçu des amorces qui permettent de faire l'amplification de ce domaine.

Pour le choix des amorces pour le domaine BH $\beta$ , j'ai fait un alignement des isoformes P85 $\alpha$  et P85 $\beta$ . D'après l'alignement, j'ai décidé que le domaine BH de P85 $\beta$  correspondrait aux acides aminés 106 à 289.

*Les amorces pour amplifier le «nouveau» domaine BH $\alpha$  sont P16 et P17.*

*Les amorces pour amplifier le «nouveau» domaine BH $\beta$  sont P18 et P19.*

Le clonage des nouveaux domaines BH a été fait exactement comme pour les autres constructions. L'absence de mutations sur les plasmides pGEX2T-«new»-BH $\alpha$  (G70 et G72) et pGEX2T-«new»-BH $\beta$  (G71 et G73) a été vérifiée par séquençage.

### **(d) Réalisation de mutants des isoformes P85 étiquetés HA**

Ne disposant pas de plasmide qui (1) permet d'apporter une étiquette HA en position N-terminale de mes inserts et (2) ne contient pas les sites de clonage BamH1 et EcoR1, j'ai décidé de créer le plasmide HA. J'ai choisi cette solution car cela m'évitait de passer par des étapes de PCR qui sont génératrices de mutations, ce qui m'aurait obligé à réaliser des séquençages par la suite. Ces séquençages sont compliqués de part la longueur des inserts et coûteux par la nécessité de séquencer 6 constructions.

#### Principe de construction du Plasmide HA :

J'ai fait synthétiser deux oligonucléotides, P11 et P12, qui portent la séquence codant pour l'Hémagglutinine et en plus de cela, ces oligonucléotides contenaient le site BamH1 qui

## Matériel et Méthodes

permet le clonage des inserts préalablement clonés dans le pGEX2T. Les séquences des amorces P11 et P12 sont présentées dans le chapitre Matériel et Méthodes.

Il n'est pas aisé de réaliser un clonage d'amorces de si petite taille et surtout il est difficile de savoir si elles ont bien été insérées dans le plasmide. Pour ce clonage, j'ai du réaliser un clonage peu conventionnel que je décris ci-dessous.

Le plasmide utilisé pour ajouter l'étiquette HA est le pRK5-Myc (voir tableau plasmides ; G28).

La construction du plasmide « HA » a été réalisée en deux étapes qui sont schématisées dans la Figure 22:

- *1<sup>ère</sup> étape : clonage de P85 $\alpha$  dans le vecteur pRK5-Myc*

Dans un premier temps, j'ai cloné l'insert P85 $\alpha$ . Pour ce faire, j'ai digéré le vecteur pGEX2T-P85 $\alpha$  (G35) par les enzymes de restrictions BamH1 et EcoR1, ensuite l'insert P85 $\alpha$  a été cloné dans le pRK5-Myc préalablement digéré par BamH1 et EcoR1 (voir Figure 22). Après transformation, l'identification des clones positifs a été faite par la méthode de « Colony Cracking » (voir Matériel et Méthodes). Les clones ainsi présélectionnés ont été vérifiés par digestion enzymatique.

J'ai ainsi obtenu le plasmide pRK5-Myc-P85 $\alpha$  bovin (G57) qui permet l'expression de la protéine chimérique Myc-P85 $\alpha$ .

- *2<sup>ème</sup> étape : clonage de l'étiquette HA dans le vecteur pRK5-Myc-P85 $\alpha$*

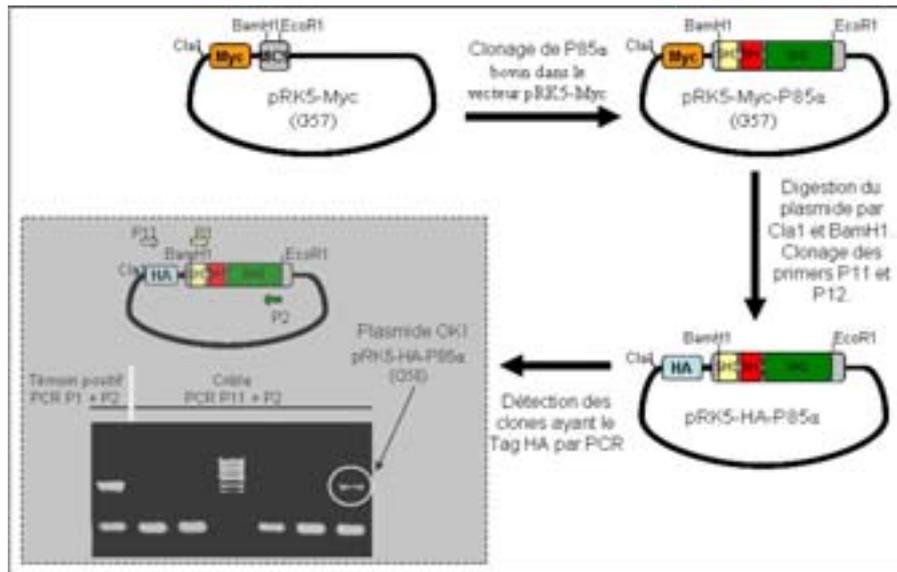
Dans un second temps, il a fallu cloner l'étiquette HA en lieu et place de l'étiquette Myc. Pour faire cela, le plasmide pRK5-Myc-P85 $\alpha$  (G57) a été digéré par les enzymes de restriction Cla1 et Bamh1 ce qui permet de libérer l'étiquette Myc. Les amorces P11 et P12 en s'hybridant forment un site compatible Cla1 et un site compatible BamH1. Ainsi les amorces P11 et P12 ont été clonées dans le plasmide pRK5-Myc-P85 $\alpha$  digéré (voir Figure 22).

- *Vérification des clones : détection par PCR*

La taille de l'insert « HA » étant très petite, je ne pouvais pas vérifier si l'insert avait été correctement cloné par simple analyse de profils de digestion. Pour vérifier, j'ai utilisé la technique de PCR sur colonies bactériennes.

Pour la PCR, j'ai utilisé l'amorce P11 spécifique de l'étiquette HA et l'amorce P2 s'hybridant en partie « C-terminale » de P85 $\alpha$ . S'il y a amplification à partir d'une colonie, ceci veut dire que la colonie contient le vecteur pRK5-HA-P85 $\alpha$ . Comme témoin positif, j'ai utilisé les amorces P1 et P2 spécifiques de P85 $\alpha$  qui permettent

l'amplification de P85 $\alpha$  (voir Figure 22). J'ai pu ainsi sélectionner plusieurs clones et j'ai par la suite vérifié que ces vecteurs permettaient l'expression de la protéine HA-P85 $\alpha$ . L'expression de la protéine HA-P85 $\alpha$  a été vérifiée par western-blot à partir de cellules A20 transfectées avec ces vecteurs. J'ai confirmé que la construction G58 permet l'expression de la protéine HA-P85 $\alpha$  (détectée par l'anticorps anti-HA 3F10 et l'anticorps anti-P85 $\alpha$  U5).



**Figure 22: Construction du plasmide HA.**

Une fois ce plasmide construit, j'ai sous-cloné les différentes constructions « P85 » clonées dans le pGEX2T, dans le vecteur G58 : pRK5-HA-P85 $\alpha$ . Vecteur préalablement digéré BamHI et EcoRI et où l'insert P85 $\alpha$  a été retiré.

Les constructions issues de ce sous-clonage ont été analysées par la technique de PCR sur colonies puis par leur profil de digestion (Pour les PCR l'amorce P11 a toujours été utilisée pour vérifier la présence de l'étiquette HA ; les amorces complémentaires utilisées sont P2, P4 et P6 respectivement pour les inserts P85 $\alpha$  $\Delta$ BH, BH $\alpha$  et BH $\beta$ ).

### **c) Transfections**

Les transfections ont été réalisées via la technique d'électroporation.

Pour l'électroporation, nous utilisons un appareillage de marque Bio-Rad. Avant électroporation, les cellules sont resuspendues dans 500  $\mu$ l de leur milieu de culture mais dépourvu de sérum puis déposées dans une cuve d'électroporation. Les conditions du choc électrique et le nombre de cellules par cuvette sont déterminés pour chaque type cellulaire (Voir Tableau 1).

**Tableau 1 Conditions des transfections par électroporation en fonction des différents types cellulaires.**

	<b>Nombre de cellules par cuvette</b>	<b>Voltage</b>	<b>Capacité</b>	<b>Résistance</b>	<b>Cuvette (distance entre les électrodes)</b>
<b>Cellules A20</b>	15 à 20 .10 <sup>6</sup>	310 V	950 µF	~	4 mm
<b>Cellules Jurkat</b>	15.10 <sup>6</sup>	310 V	950 µF	~	4 mm
<b>Cellules PAE (tous types)</b>	10.10 <sup>6</sup>	250 V	950 µF	~	4 mm

#### **d) Techniques biochimiques**

##### **(1) Western-Blot**

Lorsqu'il n'est pas précisé, le tampon de lyse utilisé correspond à une solution contenant du Tris pH 7.5 100mM, NaCl 150mM, EDTA 5mM, NP40 1%. Le tampon de lyse est complété extemporanément par : PMSF 2mM, Aprotinine 2mM, Orthovanadate 0.2mM, NaF 1mM et enfin un cocktail d'inhibiteurs « SPI » (Pepstatin A, Leupeptine, Chymostatin) à 1mM. Le tampon de lyse est utilisé à raison de 50µL pour 2.10<sup>6</sup> cellules, la lyse est effectuée sur glace pendant 10 minutes. Après centrifugation à une vitesse de 14000 rpm à 4°C, la concentration protéique de l'échantillon est déterminée par la méthode de Bradford en utilisant une courbe standard d'albumine. L'électrophorèse des protéines est réalisée en gels SDS-PAGE. Pour la préparation des dépôts, on ajoute aux échantillons le tampon de charge (concentration 6X: glycérol 60%, Tris pH 6.8 300mM, EDTA 12mM, SDS 12%, β-mercaptoethanol 864mM, Bleu de Bromophénol 0.05%) puis les échantillons sont incubés 5 minutes à 100°C. L'électrophorèse est faite à voltage constant, 80 V pour la migration dans la partie « running » du gel puis 150V pour le reste de la migration. Après l'électrophorèse, les protéines sont transférées sur une membrane PVDF (Immobilon, Millipore) et ce transfert « liquide » est fait avec un appareillage Bio-Rad avec un voltage constant de 120V pendant 50 minutes. Après transfert, la membrane est mise à « bloquer » pendant 1 heure dans une solution de PBS-T, 5% lait, alternativement pour la détection de protéines phosphorylées, on utilise comme solution de blocage du TBS, 5% BSA. Les membranes sont ensuite traitées comme décrit dans le protocole du kit « ECL » (Amersham Pharmacia Biotech). Pour précision, toutes les membranes utilisées sont traitées avec le tampon PBS-T, seules les

## Matériel et Méthodes

membranes utilisées pour la détection de protéines phosphorylées sont traitées de bout en bout avec une solution de TBS-T.

PBS-T : PBS avec 0.05% de Tween 20

Tris Buffered Saline / TBS: Tris pH 7.5 20mM, NaCl 154mM.

TBS-T : TBS avec 0.05% Tween 20

Marqueur de poids moléculaire : marque Bio-Rad Precision Plus Protein Prestained Standards All blue.

### ***(2) Immuno-précipitation***

Pour les expériences d'immuno-précipitation, nous avons utilisé un tampon de lyse particulier: tampon Co-IP: Tris pH 7.5 20mM, NaCl 150 mM, EDTA 2 mM, Brij 97 0.875%, NP-40 0.125% et toujours extemporanément on ajoute des inhibiteurs (cf western-blot). La lyse est effectuée sur glace pendant 30 minutes avec 500 µl de tampon Co-IP pour 10.10<sup>6</sup> cellules. Après centrifugation (14000 rpm, 4°C), le lysat est prélevé avec 100µl de « billes » protéine-G-Sepharose (sigma P3296) pour 1ml de lysat pendant 10 minutes, 4°C. Suite à l'étape de prélavage, le lysat est mis à incuber avec l'anticorps (3 à 4 µg) pendant 1 heure à 4°C et sous agitation, au bout de cette heure, le complexe immunitaire est capturé avec 100µl de protéine-G-Sepharose pour 1ml de lysat pendant 1 heure à 4°C sous agitation. Enfin, après récolte des billes porteuses des complexes immunitaires et 3 lavages avec le tampon de lyse, les billes sont reprises avec 100µl de tampon de charge 1X et mises à bouillir 5 minutes à 100°C. Les échantillons sont ensuite analysés par le biais d'un western-blot classique.

### ***(3) Production de Protéines***

Toutes les constructions clonées dans le vecteur pGEX2T ont été transformées dans la souche bactérienne BL21. Cette souche permet une bonne expression de la protéine en réponse à l'IPTG.

- Le protocole d'expression identique pour toutes les constructions est le suivant :

Une pré-culture de 50 ml de milieu LB + antibiotiques est mise en culture la nuit à 37°C. Le lendemain cette pré-culture est utilisée pour inoculer 450ml de milieu LB + antibiotiques. Au bout d'une heure de culture à 37°C, j'ajoute de l'IPTG à une concentration finale de 0.1 mM, l'induction est conduite pendant 2 heures à 37°C. Les cellules sont alors sédimentées par centrifugation 10 minutes 4°C 5000 rpm. Toutes les étapes sont ensuite réalisées dans la glace

## Matériel et Méthodes

ou à 4°C. Le culot bactérien est resuspendu avec 25 ml de PBS 1X froid (plus 10 µg/ml SPI, 0.5 mM PMSF) puis soniqué (4 séries de : 30 sec d'ultrasons, 30 sec dans la glace ; Amplitude 40, sur appareil Bioblock vibracell 75022). Un détergent, le Triton X-100 (concentration finale 1%) est ajouté au lysat. Le lysat est alors mis sous agitation à 4°C pendant 30 min. Après ce laps de temps, le lysat est centrifugé 10 min à 4°C 10000 rpm. Le surnageant contient la protéine surexprimée.

- Protocole de purification sur billes Glutathion-Agarose :

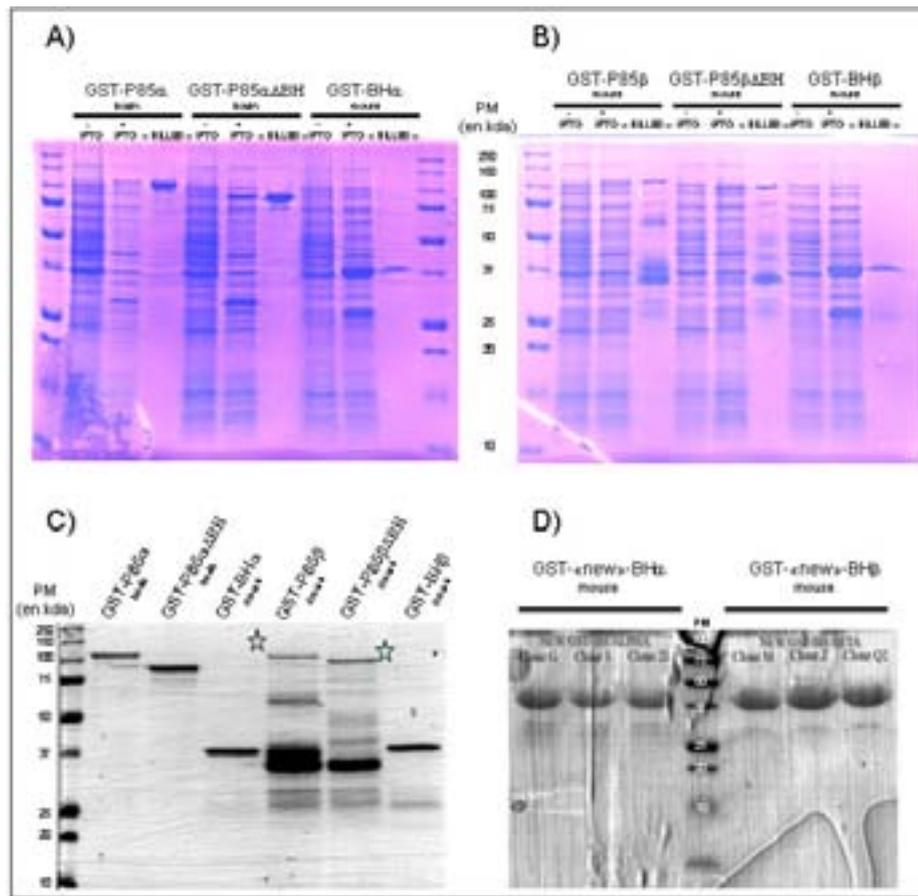
Les billes de Glutathion-Agarose équilibrées à 50% en PBS 1X, sont lavées 3 fois par du PBS 1X avant utilisation. 1ml de la solution de billes à 50% est ajouté au surnageant obtenu précédemment, le tout est mis sous agitation pendant 1 h à 4°C. Les billes sont alors sédimentées par centrifugation lente 800 rpm quelques secondes (à 4°C), puis lavées 3 fois par une solution de PBS 1X. La solution de billes est alors ramenée à 50% dans du PBS 1X. Ayant fixées la protéine d'intérêt, les billes sont alors prêtes à l'emploi.

- Vérification de l'expression des protéines chimériques :

Production des protéines : GST-P85 $\alpha$ , GST-P85 $\alpha$  $\Delta$ BH, GST-BH $\alpha$ , GST-P85  $\beta$ , GST-P85  $\beta$   $\Delta$ BH et GST-BH  $\beta$ .

L'expression et la purification ont été vérifiées par électrophorèse en gels d'acrylamide puis par coloration au bleu de Coomassie. Une quantification de la quantité de protéines purifiées peut être estimée par l'ajout d'une gamme de BSA lors de l'électrophorèse.

La Figure 23 montre que les protéines sont correctement synthétisées et purifiées. La Figure 23 (A et B) montre l'induction et la purification des différentes protéines ; nous avons vérifié par western-blot que ces protéines étaient effectivement reconnues par un anticorps anti-GST (voir Figure 23 C). Enfin dans la Figure 23 D, je montre que les nouveaux domaines BH peuvent de la même façon être induits et purifiés sur bille Glutathion-Agarose.



**Figure 23 Expression des protéines de fusion étiquetées avec la GST. A) Expression des protéines recombinantes de l'isoforme P85 $\alpha$  ; GST-P85 $\alpha$ , GST-P85 $\alpha$  $\Delta$ BH, GST-BH $\alpha$  ; les pistes représentent les lysats bactériens avant induction, après induction à l'IPTG puis la piste « billes » représente les protéines purifiées sur billes Glutathionne-Agarose. B) Idem que A) pour les protéines recombinantes de l'isoforme P85 $\beta$  ; GST-P85 $\beta$ , GST-P85 $\beta$   $\Delta$ BH, GST-BH $\beta$ . C) Les protéines recombinantes GST-P85 $\alpha$ , GST-P85 $\alpha$  $\Delta$ BH, GST-BH $\alpha$ , GST-P85 $\beta$ , GST-P85 $\beta$   $\Delta$ BH, GST-BH $\beta$  purifiées sur billes Glutathionne-Agarose détectées par western-blot avec l'anticorps anti-GST (les astérisques indiquent la bande correspondant à la protéine recherchée). D) Les protéines GST-«new»BH $\alpha$  et GST-«new»BH $\beta$ , issues de 3 vecteurs différents, après purification sur billes Glutathionne-Agarose. Visualisation après coloration au bleu de Coomassie.**

**(4) Gels non dénaturants**

La composition des gels d'acrylamide est parfaitement identique à celle des gels utilisés en SDS-PAGE, à un détail près, les gels non dénaturants sont réalisés sans SDS.

Le tampon de migration utilisé est une base identique à celui utilisé en SDS-PAGE auquel on n'ajoute pas de SDS. (Tampon Tris-Glycine sans SDS). Le tampon de charge utilisé pour faire les dépôts d'échantillon est un tampon non dénaturant : concentration 6X: glycérol 60%, Tris pH 6.8 300mM, EDTA 12mM, Bleu de Bromophénol 0.05%. L'électrophorèse est réalisée avec une tension de 50V pendant environ 12 heures pour un gel 10%.

**(5) Coloration au bleu de Coomassie**

Les protéines séparées sur gels d'acrylamide dénaturants ou natifs ont été colorées par la méthode du bleu de Coomassie. Le gel d'acrylamide est plongé pendant 30 min dans une solution de coloration qui va permettre de fixer les protéines et aussi de les colorer. Après cette incubation le gel est plongé dans des bains de solution de décoloration. En général, 3 bains de 5 minutes suffisent pour décolorer le gel, le nombre de bains est adapté en fonction de l'intensité de coloration

Solution de coloration : pour 100 ml ; 0.25 g de bleu de bromophénol, 45 ml d'Ethanol 100 %, 5 ml acide acétique glacial, qsp H<sub>2</sub>O. Solution de décoloration : pour 100 ml ; 30 ml d'Ethanol 100 %, 10 ml acide acétique glacial, qsp H<sub>2</sub>O.

**(6) Précipitation des petites GTPases – GST pull-down**

La précipitation des protéines Rac et Cdc42 sous forme GTP est réalisée grâce au domaine « Cdc42/Rac Interactive Binding » (CRIB) de Pak. L'insert codant pour ce domaine a été cloné dans le plasmide pGEX-2T, qui permet l'expression d'une protéine chimérique, fusion de la Glutathione S-transferase (GST) et du domaine CRIB.

- Expression et purification de la protéine GST-CRIB :

La bactérie est mise en pré-culture dans 50 ml de LB durant toute une nuit, le lendemain ces 50 ml sont utilisés pour ensemercer 450 ml de LB frais. Après 1 heure à 37°C, on ajoute de l'IPTG 0.1 mM final pendant 2 heures pour induire la synthèse de la protéine chimérique. Après centrifugation 10 minutes 4000 rpm à 4°C, le culot est repris dans 25 ml de PBS froid + inhibiteurs (10 µg/ml SPI, 0.5 mM PMSF) puis soumis aux ultrasons, 4 séries de : 30 sec d'ultrasons, 30 sec dans la glace. (Amplitude 40, sur appareil Bioblock vibracell 75022). Enfin du Triton X-100 est ajouté (1% final) et le lysat est mis à agiter

## Matériel et Méthodes

sur une roue à 4°C pendant 30 minutes. Après centrifugation (10000 rpm, 10 minutes, 4°C), le lysat est mit à incuber 1 heure, 4°C, sous agitation, en présence de 1ml de billes Glutathione-Sepharose 50% préalablement lavées en PBS. Les billes sont ensuite lavées 3 fois en PBS et conservées à 4°C en présence de PBS + inhibiteurs.

### **(7) Elution**

Les protéines purifiées sur billes Glutathione-Sepharose, ont été éluées de ces dernières en fonction des expériences. Le tampon d'éluion est le suivant : 25 mM de Glutathione (sigma), 50 mM Tris HCl pH 8. Le pH de la solution est ramené à 8 par ajout de NaOH (1N). La solution de billes 50%, contenant les protéines purifiées, est asséchée par aspiration avec une seringue, puis on ajoute sur les billes le tampon d'éluion (à 50%). Le tout est mis sous agitation pendant 10 minutes à 4°C. Les billes sont asséchées, la solution contenant les protéines éluées prélevée et est conservée à 4°C.

### **(8) Dialyse**

La dialyse dans mon cas a été nécessaire après l'éluion des protéines de fusion avec la GST.

Cette étape a été réalisée pour éliminer la glutathione utilisée pendant l'éluion.

La dialyse a été réalisée dans des boudins de dialyse de marque Pierce (SnakeSkinT Dialysis Tubing, 7K MWCO, #68700). Environ 500 µl de solution à dialyser ont été placés dans le boudin de dialyse. La dialyse a été conduite contre 5 litres d'une solution de PBS froide et sous agitation pendant toute une nuit à 4°C. Suite à cela, le contenu du boudin de dialyse a été récupéré et stocké à 4°C. La quantité de protéines restante, suite à cette étape, a été évaluée par électrophorèse en gels d'acrylamide puis coloration avec du bleu de Coomassie.

### **(9) Quantification**

Pour quantifier les résultats obtenus en Western-Blot, j'ai utilisé le logiciel de quantification Image J (Abramoff, M.D., Magelhaes, P.J., Ram, S.J. "Image Processing with ImageJ". Biophotonics International, volume 11, issue 7, pp. 36-42, 2004.).

## **e) Techniques d'imagerie**

### **(1) Immunofluorescence**

Pour faire les immunofluorescences, les cellules sont mises en culture sur des lamelles de verre, avant d'avoir atteint la confluence, les cellules sont fixées avec du paraformaldéhyde 3% préparé dans du Cytoskeletal Buffer, CB, (10 mM MES : acide morpholineethanesulfonic, 150 mM NaCl, 5 mM EGTA, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, et 5 mM glucose [pH 6.1]) pendant 10 minutes a température ambiante. Les cellules sont ensuite perméabilisées avec une solution de Triton X-

## Matériel et Méthodes

100 0.1% pendant 1 minute. Après 3 lavages successifs avec du CB, les cellules sont incubées dans une solution de blocage (BS pour Blocking Solution, 1% bovine serum albumin et 2% de sérum de veau fœtal dans du TBS) pendant 5 minutes puis dans une solution de BS contenant l'anticorps primaire dilué pendant 30 minutes et après 3 lavages dans une solution de TBS, les cellules sont incubées finalement avec l'anticorps secondaire conjugué à un fluorochrome, dilué dans du BS, pendant 30 minutes. Encore 3 derniers lavages en TBS, puis les lamelles sont lavés à l'eau et enfin montées sur des lames de microscope avec du Fluoromount Mounting Medium.

Pour tout ce qui n'est pas des immunomarquages, tels que le marquage des noyaux par le Hoescht ou le marquage de l'actine via les Phalloïdines conjuguées à un fluorochrome, (marquages se faisant en une seule étape), ces composants ne sont ajoutés qu'au moment correspondant à l'ajout de l'anticorps secondaire.

Les anticorps secondaires de type Alexa 488 et 546 couplés au FITC ainsi que le Hoescht 33342 (utilisé au 1/50 000<sup>e</sup>) proviennent de chez Molecular Probes.

Les marquages de l'actine ont été réalisés par l'utilisation de la phalloïdine couplée à un fluorochrome: l'Alexa 546 (Invitrogen, 1/400<sup>e</sup>), soit le FITC (Sigma, 1/600).

Les dilutions utilisées en immunofluorescence pour les anticorps sont indiquées dans le « Matériel et Méthodes », partie « Anticorps ».

### ***(2) Acquisition des images***

Les cellules ont été analysées par microscopie à épifluorescence sur un microscope inversé: Nikon TE2000 avec soit un objectif 40x (NA 1.30) soit un objectif 60x (NA 1.40).

Les cellules ont pu être également analysées par microscopie confocale sur un microscope inversé de marque ZEISS : LSM 510 META, objectif 63x (NA 1,4).

### ***(3) Traitement des images***

Le traitement des images de microscopie a été réalisé par le logiciel Adobe® Photoshop CS.

## **D. Résultats – Discussion**

### **1. Première Partie : L'activité de la protéine kinase Akt est contrôlée par la GTPase Rac et la phosphatase SHIP en conditions non adhérentes.**

#### **a) Introduction du papier**

Dans l'article présenté ici, nous explorons la régulation d'Akt par les isoformes Rac1 et Rac2 en faisant varier les conditions expérimentales et le type cellulaire. Ces travaux font suite à la découverte que la protéine Akt pouvait être activée par Rac (Genot, Arriemerlou et al. 2000). Le modèle utilisé était les cellules Jurkat (J.HM1). De l'utilisation de ce modèle ont découlées certaines questions auxquelles nous répondons dans cet article.

- Les Jurkat sont des cellules hématopoïétiques : ce type cellulaire exprime spécifiquement une isoforme de Rac : Rac2. Nous avons évalué l'activation d'Akt en utilisant soit l'isoforme hématopoïétique Rac2 soit la forme ubiquitaire Rac1.
- L'établissement de la lignée cellulaire Jurkat s'est suivi d'une altération des mécanismes de régulation de la mort cellulaire, et en particulier les cellules Jurkat sont devenues déficientes en PTEN (régulateur négatif de la protéine Akt). Nous avons donc vérifié que ce n'était pas l'absence de PTEN qui rendait possible l'activation d'Akt par Rac.
- Les cellules Jurkat sont un modèle hématopoïétique, nous avons recherché si l'activation d'Akt par Rac était restreinte ou non aux lignées hématopoïétiques.

**b) “The GTPase Rac and the phosphatase SHIP control Akt activity under non adherent conditions”**

**Non-adherent cells switch to an alternative, Rac-mediated, activation of Akt/PKB, a pathway dependent on SHIP inactivation**

**Benjamin Chaigne de la Lande, Gueric Anies, JJsbrand Kramer and Elisabeth Genot**

European Institute of Chemistry and Biology, University of Bordeaux I, Talence and  
INSERM Unité 441, Université Victor Segalen Bordeaux 2, Bordeaux, France

Number of text pages: table, 0. figures: 9

Number of characters abstract:

Number of characters in the manuscript:

**Running title: Rac and SHIP regulate Akt in non adherent cells**

**Key words: GTPases, Akt, SHIP/SHIP2, adhesion, signal transduction**

\* Correspondence to Elisabeth Génot, European Institute of Chemistry and Biology,

University 2, rue Robert Escarpit, 33 600 Pessac, France

Phone: +33 (0) 5 40 00 30 56

Fax: +33 (0)5 40 00 87 26

e-mail: e.genot@iecb.u-bordeaux.fr

## SUMMARY

We previously showed that Rac1 stimulated Akt in T lymphocytes cultured in suspension. This regulation contrasts with findings obtained in fibroblasts, endothelial or neuronal cells grown on substrate, where Akt regulation appears to be independent of Rac. In the present study, we have explored several aspects of Akt regulation which could account for this discrepancy. Using various cell lines and transient transfection protocols, we now show that the regulation of Akt by Rac is not dependent on the Rac isoform, nor on the expression of the tumour suppressor PTEN, and that this pathway is not restricted to the hematopoietic lineage. In contrast, the stimulation of Akt by Rac was found to be dependent on cell adhesion and SHIP expression. In suspended cells, but not in adherent cells, Rac and Akt were associated in a complex where both were found in their active state. Furthermore, deletion of SHIP promoted Akt and Rac association whereas overexpression of SHIP reduced it. Our data reveal the existence of a *bona fide* Rac → Akt signaling pathway operational only in suspended cells and point to an alternative survival signal that is called into action when cells lose contact with the substrate and/or with other cells.

## INTRODUCTION

Akt (also known as PKB), is a serine/threonine protein kinase originally discovered as the oncogene product of the transforming AKT8 virus responsible for spontaneously arising leukemia and lymphoma (Staal, 1987). The role of Akt in maintaining cell survival has been

***Résultats-Discussion : Première Partie*** «L'activité de la protéine kinase Akt est contrôlée par la GTPase Rac et la phosphatase SHIP en conditions non adhérentes.»

extensively described and involves several mechanisms. It occurs through direct effects on the apoptosis machinery by targeting the pro-apoptotic Bcl-2 related protein BAD, by affecting the transcriptional response to apoptotic stimuli, by regulating Forkhead factors and also by influencing the activity of the p53 family (Downward, 2004). In lymphocytes, Akt is stimulated by antigen receptors (Ward et al., 1992), by co-stimulatory receptor CD28 in naïve T cells (Ward et al., 1996), by OX40 on activated and memory T cells (Song et al., 2004; Ward et al., 1996) and by cytokines or chemokine receptors. In adherent cells, Akt is also regulated by soluble factors but cell survival is strictly dependent on its activation by integrins at focal adhesion contacts or cell-cell interactions (Frisch and Ruoslahti, 1997; Watton and Downward, 1999). Consequently, disruption of the interaction between cells and/or extracellular matrix induces apoptosis (anoikis) (Ruoslahti and Reed, 1994), a process which can be rescued by activating Rac1 (Coniglio et al., 2001). The ability to escape anoikis is thus a critical step in oncogenesis.

Akt contains two phosphatidylinositol-3 kinase (PI3K)-dependent phosphorylation sites, one in the activation loop (T308) and the other in the carboxyl-terminal tail (S473). Under physiological conditions, the phosphorylation of T308 appears to be coordinately regulated with the phosphorylation of S473. Under experimental conditions, however, the two sites can be uncoupled, suggesting that their phosphorylation is controlled by different kinases and phosphatases. PI3K phosphorylates the 3'-OH position of the inositol ring of phosphoinositids. The predominant substrate for receptor coupled PI3Ks is PtdIns(4,5)P2 and hence the initial product of PI3K action is PtdIns(3,4,5)P3. Akt possesses an N-terminal pleckstrin homology domain (PH domain) which binds specifically to PtdIns(3,4,5)P3 and PtdIns(3,4)P2 with similar affinity (Thomas et al., 2002). PtdIns(3,4,5)P3/PtdIns(3,4)P2 recruits Akt from the cytosol to the plasma membrane and also induces a conformational

**Résultats-Discussion : Première Partie** «L'activité de la protéine kinase Akt est contrôlée par la GTPase Rac et la phosphatase SHIP en conditions non adhérentes.»

change that converts Akt into a substrate that can be phosphorylated on T308 by the phosphoinositide-dependent kinase 1 (PDK1). PDK1 is also regulated by PI3K products through its PII domain which interacts with PtdIns(3,4,5)P3/PtdIns(3,4)P2 and with lower affinity to PtdIns(4,5)P2 (Komander et al., 2004). Regulation of the S473 site is more complex as it has been reported to be phosphorylated by at least three distinct kinases, including ILK (Troussard et al., 2003), DNA-PK (Feng et al., 2004) and Akt itself (Toker and Newton, 2000). The activated kinase then detaches from the membrane and phosphorylates its substrates located both in the cytosol and nucleus. PtdIns(3,4,5)P3/PtdIns(3,4)P2 are substrates for inositol lipid phosphatases so Akt activity is also modulated by this class of regulatory molecule (Freeburn et al., 2002). One of these is PTEN (Phosphatase and Tensin homolog deleted on chromosome 10), a powerful tumor suppressor deleted or mutated in a variety of primary human cancers (Haas-Kogan et al., 1998; Suzuki et al., 1998). PTEN dephosphorylates PtdIns(3,4,5)P3 into PtdIns(4,5)P2 and thereby antagonizes the effects of PI3K on apoptosis and cell migration (Stambolic et al., 1998). This pathway is also kept in check by the widely expressed SH2-containing Inositol 5-Phosphatase SHIP2, or its hematopoietic-restricted homologue SHIP (also known as SHIP1), which breaks PtdIns(3,4,5)P3 into PtdIns(3,4)P2 (Kalesnikoff et al., 2003). PTEN, SHIP and SHIP2 activities are regulated *in vivo* by modulation of their protein levels (Sly et al., 2003). Although activation of Akt is mainly dependent on phosphoinositide levels, some molecules can alter Akt activity by direct binding to the kinase (Du and Tschlis, 2005; Laine et al., 2000; Maira et al., 2001). Amongst these is CTMP (Carboxyl Terminal Modulator Protein), a physiologically expressed regulator which attenuates Akt activity by masking the S473 phosphorylation site, thereby preventing access to the upstream kinase.

***Résultats-Discussion : Première Partie «L'activité de la protéine kinase Akt est contrôlée par la GTPase Rac et la phosphatase SHIP en conditions non adhérentes.»***

The small GTPase Rac1 regulates cytoskeletal organization, cell cycle progression, gene expression and oncogenic transformation (Qiu et al., 1995), which depend upon both soluble growth factors and integrin- or cadherin-mediated adhesion. Like most GTPases, Rac1 cycles between the GDP inactive form and GTP-bound active conformation and behaves as a molecular switch for signaling. Hematopoietic cells display Rac2, another isoform of Rac, which presents both structural and functional differences with Rac1 despite their high sequence homologies (Van Hennik and Hordijk, 2005).

In several models, it has been shown that an active form of Ras (V12Ras) activates PI3K, which in turn regulates Akt. However, further investigation demonstrated that depending on the ligand, PI3K can be regulated by either Ras-dependent or Ras-independent pathways (van Weering et al., 1998). Moreover, Akt regulation has clearly been shown to be independent of Rac1 in fibroblasts (Marte et al., 1997), endothelial cells (Welch et al., 1998) or neuroectoderm-derived cells (van Weering et al., 1998). Interestingly, in the T cell leukemic cell line model Jurkat, active Ras is unable to regulate Akt (Genot et al., 2000). Instead, Akt activation was induced by constitutively active mutants of Rac1, although Akt activation upon T cell receptor triggering remained dependent on a functional PI3K. Likewise, Akt regulation by Rac1 has also been reported in the pro-B cell line model BaF3 (Nishida et al., 1999), suggesting that this mode of regulation can also apply to B cells. A similar regulatory pathway has been described in the context of cell motility in non-lymphocytic models (Ifiguchi et al., 2001; Soga et al., 2001a; Soga et al., 2001b). However, the molecular basis for Akt activation by Rac GTPases remains unknown.

In the present study, we explored the regulation of Akt by Rac isoforms, in different cell types and under various experimental conditions. We report that Rac mediated activation of Akt is a

characteristic of non-adherent cells, independent of their cell lineage, and that this process is under the control of the 5'inositol phosphatases SHIP/SHIP2.

## RESULTS

### **1/ Both Rac1 and Rac2 are able to stimulate Akt activity in Jurkat cells**

Although Rac1 is the most common Rac isoform, hematopoietic cells also express another isoform, Rac2. In the first set of experiments, we compared the ability of Rac1 and Rac2 to regulate Akt using myc-tagged constitutively active mutants of Rac isoforms. To this end, L61Rac1 or L61Rac2 encoding plasmids were transiently expressed in cells from the Jurkat JHM1 T-cell clone and Akt activity was measured in an *in vitro* kinase assay using histone 2B (H2B) as substrate. Data presented in Fig. 1A show that Rac1 and Rac2 were equally able to activate Akt in Jurkat cells. To assess the functional status of Akt in intact cells, Akt phosphorylation sites were examined by western blot using phospho-specific antibodies. Phosphorylation was increased on both T308 and S473 in response to either L61Rac1 or L61Rac2 (Fig. 1B). Since Rac1 is the ubiquitously expressed isoform of Rac, further investigation of the regulation of the Rac → Akt pathway was carried out with Rac1.

### **2/ PTEN deficiency does not account for Rac-induced Akt activation in Jurkat cells**

Transformation of normal T cells into leukemic cells or establishment of cell lines in culture is inevitably associated with alteration or loss in programmed cell death control. One such mechanism is the loss of the tumor suppressor PTEN, which results in increased cell survival due to the lack of its negative feedback on Akt activity. The Jurkat JHM1 T-cell clone is deficient for PTEN (Astoul et al., 2001). To explore whether the absence of PTEN plays a role in the observed effect of Rac1 on Akt activation in Jurkat cells, we investigated whether or not

Rac1 could still stimulate its activity when PTEN was re-introduced into these cells. As expected, kinase assays showed a strong reduction in basal levels of Akt activity in the presence of PTEN (Fig. 2A). However, expression of active Rac1 still raised Akt activity in PTEN transfected cells and with the same order of magnitude. Expression of a membrane-targeted version of PTEN, PTEN CAAX (which facilitates access to substrates) was not significantly different from those obtained with wild type PTEN. In contrast, a dead version of the phosphatase had no effect (Fig. 2A). Re-introduction of PTEN reduced phosphorylation on both T308 and S473 (Fig. 2B) but again, the stimulatory effect of Rac1 remained intact. To further exclude the possibility that Rac1-induced stimulatory effect on Akt could be a general feature of cells lacking endogenous PTEN, we analyzed Akt regulation in the PTEN-defective cells line UMUC3 derived from a bladder carcinoma (Parekh et al., 2000). Constitutively active Rac1 was unable to stimulate Akt activity in these cells whereas a constitutively active mutant of PI3K (a membrane-targeted version of the catalytic subunit, rCD2p110 (Reif et al., 1996) enhanced Akt activity (Fig. 2C). Taken together, these results show that the stimulatory effect of Rac1 on Akt activity is not a general feature of cell lines lacking PTEN and indicate that Rac1 regulates Akt through another mechanism.

### **3/ SHIP is involved in Rac-induced Akt activation**

The ubiquitously expressed lipid phosphatase SHIP2 and its lymphocyte-restricted SHIP1 (or SHIP) homologues mediate important feedback mechanisms on Akt regulation (Krystal, 2000). We therefore designed experiments to explore the impact of the absence of SHIP on Rac1-induced Akt activity. To this end, we used an already established SHIP-deficient cell line (Ono et al., 1997), DT40 SHIP<sup>-/-</sup>, where the gene encoding SHIP has been mutated by homologous recombination. DT40 were not found deficient for PTEN expression (data not shown). Akt activity was found upregulated upon expression of V12Rac1 in DT40 cells (Fig.

3A). When comparing DT40 SHIP<sup>-/-</sup> with its wild type counterpart in kinase assays, the ability of Rac1 to elicit Akt activity was found greater in cells defective for SHIP expression (Fig. 3A). Analysis of Akt phosphorylation status revealed that in the absence of SHIP, the stimulatory effect of Rac1 was more pronounced on T308 when compared to S473 (Fig. 3B).

#### **4/ Rac regulates Akt in non-adherent hematopoietic cells but not in adherent hematopoietic cells**

After co-transfection of different cell lines with plasmids encoding HA-Akt and V12Rac1, we observed an increase in Akt phosphorylation in some hematopoietic cells lines such as HPB-ALL (acute leukemia T cells), Kit225 (T lymphocytes) (Fig. 4A), U937 (pro-myelocytic) or BL41 (Burkitt lymphoma) (data not shown) but not in other cells such as Raw (macrophage-derived), HcLa (epithelial origin) and PAE cells (endothelial origin) (Fig. 4A). HcLa, PAE and Raw cells differ from the others by their property to adhere to plastic culture dishes. These results suggested that the Rac → Akt pathway may operate only in non-attached cells. To explore this hypothesis further, we tested Rac1-mediated activation of Akt in a mast cell line, RBI-2H3, which can be cultured under either condition (Grodzki et al., 2003). RBI-2H3 cells were co-transfected with plasmids encoding V12Rac1 and Akt and then cultured either on tissue culture-treated dishes or bacterial dishes to which the cells do not adhere. Data presented in Fig 4B show that Akt phosphorylation was increased, on both sites, but only in cells cultured in suspension but not in adherent cells (despite similar levels of V12Rac1 expression). These results show that adherent RBI-2H3 cells display all the components of the Rac → Akt pathway, which is switched on when cells are prevented from attaching to the substratum. We therefore conclude that Akt regulation by Rac1 arises from the non-adherent status of the cells.

**5/ Rac stimulates Akt activity in suspended cells, regardless of their cell lineage**

To investigate further the importance of attachment to the substratum in the Rac1-mediated activation of Akt, we explored the response of non-adherent, non-hematopoietic cells to increased levels of Rac1 activity. To this end, we used an established porcine aortic endothelial cell line (PAE) in which expression of V12Rac1 is under the control of an IPTG-inducible promoter (V12Rac-PAE) (Welch et al., 1998). V12Rac-PAE cells were treated with IPTG to induce V12Rac1 expression and cells were either grown on tissue culture-treated dishes to allow cell adhesion or cultured in suspension on bacterial dishes, as described above. Again, Akt activation and phosphorylation were observed only in V12Rac-PAE suspended cells (Fig. 5A), which correlated with enhanced phosphorylation on T308 and S473 (Fig. 5B).

**6/ Both adhesion and SHIP antagonize the activation of Akt by Rac1**

The experiments presented above indicated that both adhesion and SHIP expression were involved in the regulation of Akt activity by Rac1, suggesting a connection between these two parameters. To discriminate the regulatory effects exerted by SHIP from those mediated by adhesion, we examined the regulation of the Rac → Akt pathway in adherent and non-adherent DT40 wild type or DT40 SHIP<sup>-/-</sup> cells. In adherent cells, the deficit in SHIP produced a dramatic increase in Akt basal phosphorylation on both sites (Fig. 6A). More importantly, in these adherent and SHIP-depleted cells, Rac1 acquired the ability to stimulate Akt phosphorylation on both sites. These results suggest that in adherent cells, deletion of SHIP suppresses an inhibitory signal which allows Rac to become a regulator of Akt activity. We conclude that in adherent cells, SHIP mediates a negative effect on basal T308 and S473 and an additional negative signal on the Rac → Akt pathway, which is released in suspended cells and manifests on both sites. Since membrane localization seems to be the critical mechanism regulating the activity of SHIP, we examined SHIP subcellular distribution by

fractionation experiments. Data presented in Fig. 6B show that the cytosolic fractions were enriched in SHIP content in suspended cells as compared to adherent cells. As expected, endogenous Rac activity was found reduced in suspended cells where integrin-mediated Rac regulation is disrupted (Fig. 6C).

CTMP has been identified as an endogenous negative regulator of Akt and is ubiquitously expressed. Therefore, the possibility remained that some changes in Akt phosphorylation could result from alterations in CTMP expression regulated by Rac1, SHIP or the adhesive status of the cells. The CTMP/Akt expression ratio was found very similar in all cases and remained unaffected by the expression of the active Rac1 mutant, by the absence of SHIP or the adhesion status of the cells (data not shown).

#### **7/ Constitutively active Rac associates with active Akt in suspended cells**

We previously established that PI3K activity is required for active Rac-mediated Akt stimulation. We also established that the PH domain of Akt is required for Rac1-mediated Akt activation (Genot et al., 2000). This domain is essential for targeting of Akt to the plasma membrane where activation occurs. However, PH domains have also been shown to bind other molecules including GTPases (Snyder et al., 2003). In the next experiment, the formation of Rac1-Akt complexes was explored in various experimental settings and investigated by means of co-immunoprecipitation protocols. Jurkat cells were co-transfected with plasmids encoding IIA-Akt together with myc-V12Rac, and Akt or Rac1 were immunoprecipitated using anti-tag antibodies (anti-IIA or anti-myc, respectively). Results presented in Fig. 7A show that immunoprecipitating IIA-Akt pulls down myc-V12Rac1. Likewise, the reciprocal immunoprecipitation of myc-V12Rac1 selectively precipitated IIA-Akt which was found to be phosphorylated (Fig. 7A). Rac1-Akt complexes were not detected

***Résultats-Discussion : Première Partie «L'activité de la protéine kinase Akt est contrôlée par la GTPase Rac et la phosphatase SHIP en conditions non adhérentes.»***

when similar experiments were performed after transfection of a tagged wild type Rac1 (wtRac1) (Fig. 7A). The same experiment carried out in the presence of the PI3K inhibitor LY429002 revealed that the formation of the complex was dependent on the phospholipid products of PI3K (Fig. 7A). Lastly, the presence of the PH domain of Akt was also required, as no complex could be detected when an HA-Akt mutant lacking the PH domain was expressed instead of the wild type Akt (Fig. 7A). Therefore, the PH domain is instrumental in the formation of the complex.

To explore the role of SHIP in the association of active Rac1 with Akt, a similar experiment was performed with SHIP-deficient cells. The representative experiment presented in Fig. 7B shows that the amount of Rac1 co-immunoprecipitated with Akt was increased in these cells (2.5-fold). The converse immunoprecipitation experiment led to similar observations. Overexpression of SHIP achieved by means of transient transfection was found to reduce the association of active Rac1 with negligible co-immunoprecipitation between the two proteins (Fig. 7B). These data indicate that the formation of the Rac1-Akt complex is promoted in the absence of SHIP.

To explore the role of cell adhesion in the association of active Rac1 with Akt, similar experiments were carried out with the V12Rac-PAE cell line when cells were cultured under adherent and non-adherent conditions, as above. Co-immunoprecipitation experiments were performed with V12Rac-PAE cells, induced or not with IPTG and cultured either in treated tissue culture (adhered cells) or bacterial (suspended cells) dishes. Data presented in Fig 7C show that the association of active Rac1 with Akt occurred only when cells were kept in suspension. To determine the functional implication of this regulation, apoptosis was measured in cells detached from the substratum and expressing either wtRac1 or active Rac1.

Data presented in Fig. 7D show that the presence of active Rac1 protected PAE cells from anoikis. This effect was abrogated in the presence of a pharmacological inhibitor of Akt activity (AI).

#### **8/ Rac does not require membrane association to stimulate Akt in suspended cells**

Adhesion controls the activation of Rho proteins through integrins and separately regulates the translocation of GTP-bound Rac1 to the plasma membrane. A specific binding site for active Rac1 has been demonstrated in adherent cells and is required for efficient coupling of the active GTPase to its effector Pak (Del Pozo et al., 2004). Consequently, Rac1-GTP remains in the cytoplasm bound to Rho guanine nucleotide dissociation inhibitor (RhoGDI) in suspended cells (Del Pozo et al., 2002; Hansen and Nelson, 2001; Tu et al., 2003). Our results predict that the coupling of Rac1 to Akt does not require membrane targeting. To verify this hypothesis, we examined the properties of a myc-tagged V12Rac1 mutant, in which cysteine 189 had been replaced by a serine (V12Rac1C189S) in order to prevent prenylation of the GTPase. This mutant is constitutively active, but deficient in binding to both membranes and RhoGDI, and is unable to activate Pak (Del Pozo et al., 2002). As expected, when assayed by fractionation, the mutant mainly localized in the cytoplasmic fraction (Del Pozo et al., 2002)(and data not shown). When expressed in Jurkat cells, this mutant was still fully able to stimulate Akt activation (Fig. 8). A dose-response experiment showed that V12Rac1C189S is a better inducer than the membrane bound V12Rac1 GTPase (data not shown). These experiments suggest that Rac1 can regulate signaling pathways in suspended cells.

#### **Discussion**

**Résultats-Discussion : Première Partie** «L'activité de la protéine kinase Akt est contrôlée par la GTPase Rac et la phosphatase SHIP en conditions non adhérentes.»

Akt plays a key role in many fundamental processes including survival and several studies performed in various models have established that in fibroblasts, epithelial and endothelial cells, this process is regulated through PI3K and in a Rac-independent manner. Our previous results obtained in Jurkat cells demonstrated that, in contrast to these adherent cells, T lymphocytes require a functional Rac for the activation of Akt upon T cell receptor triggering (Genot et al., 2000). This finding, also reported in the pro-B BaF3 cell line in response to IL3 (Nishida et al., 1999), suggested the existence of an alternative route for Akt activation in suspended hematopoietic cells. By using the ability of mast cell line RBL-2H3 cells to grow under either adherent or non-adherent conditions, we now provide evidence that an active form of Rac1 selectively upregulates Akt activity when cells are kept in suspension but is unable to do so when cells are cultured adherent to a substratum. Given the importance of Akt in the rescue from apoptosis induced by loss of adherence (Cheng et al., 2004; Coniglio et al., 2001), circulating haematopoietic cells may have developed another pathway to regulate Akt, allowing them to survive under non-adherent conditions in the blood stream.

We also demonstrate that this pathway is not restricted to cells of the hematopoietic lineage and can be operational in other cell types when cells are cultured under non-adherent conditions. These *in vitro* conditions may reflect an *in vivo* situation where adherent cells have to detach from the substratum in the course of a physiological process. For instance, in the process of wound healing, damaged tissues become revascularized through angiogenesis. To move into the wound, newly formed endothelial cells must detach from the parent vessel, which could make them sensitive to anoikis. In support of this hypothesis, VEGF (vascular endothelial growth factor) has been shown in migrating endothelial cells to regulate Akt through a Rac-dependent pathway, which could protect them from apoptosis in this situation (Soga et al., 2001b). Expression of a constitutively active Rac1 in PAE cells bypasses the

***Résultats-Discussion : Première Partie «L'activité de la protéine kinase Akt est contrôlée par la GTPase Rac et la phosphatase SHIP en conditions non adhérentes.»***

VEGF signal and selectively triggers Akt activation in suspended cells but not in adherent V12Rac1-expressing cells.

Similar mechanisms could also be involved during the dissemination of cancer cells. Indeed, an important characteristic of transformed cells is the loss of anchorage-dependent growth control, thereby disrupting the essential surveillance mechanism that prevents cells from colonizing elsewhere when they are detached from their normal residence. In addition to this survival advantage, Rac1-mediated Akt activation promotes cell motility (Higuchi et al., 2001) and invasiveness (Keely et al., 1997) of tumor cells. Inopportune activation of Rac may occur in transformed cells where signaling pathways are profoundly altered, thus providing means for tumor cells to simultaneously escape anoikis and promote invasiveness (Kim et al., 2001).

The RBL-2H3 model is useful for exploring the differential regulation of Akt in adherent versus suspended cells. During the process of adhesion, cell spread occurs after initial attachment of cells to immobilized extracellular matrix ligands engaged by integrins, which initiate cellular signaling cascades (Yamada and Miyamoto, 1995) and the basal Akt activity required for maintenance of cell survival. When grown in tissue-culture dishes, RBL-2H3 cells upregulate integrins (Grodzki et al., 2003). One possibility is that signaling through these integrins induces an inhibitory signal that prevents regulation of Akt by Rac1.

Because SHIP activity does not change following extracellular stimulation, the current consensus is that SHIP mediates its regulatory effects by translocating to sites of PtdIns(3,4,5)P3 production. Experiments performed in SHIP-depleted cells have demonstrated several levels of regulation on Akt. First, as observed in many cells, removal of SHIP enhanced basal Akt phosphorylation, which can be explained by PtdIns(3,4,5)P3 accumulation

***Résultats-Discussion : Première Partie «L'activité de la protéine kinase Akt est contrôlée par la GTPase Rac et la phosphatase SHIP en conditions non adhérentes.»***

due to reduced degradation of the lipid products of the PI3K. Second, in adherent cells, depletion of SHIP mimicked the situation observed in suspended cells i.e., Akt became responsive to Rac1 signals, which translated into a global increase in its activity. Analysis of Akt phosphorylation sites showed increased phosphorylation on T308 and S473. Third, in non adherent cells, depletion of SHIP stimulated the Rac1-induced T308 phosphorylation further. T308 and S473 are phosphorylated by distinct kinases and are subjected to different regulations. We can speculate that S473 phosphorylation might be regulated by distinct kinases in adherent and suspended cells. This latter effect would result from the balance of phospholipids produced in this situation, stimulating PDK1 activity further and not the S473 kinase operating in suspended cells. In our experimental conditions, the expression of CTMP, another regulator of Akt activity, was altered neither by the activation of Rac1, by the expression of SHIP nor by cell detachment.

The mechanism by which SHIP controls the Rac → Akt pathway is presently unknown. SHIP/SHIP2 are regulated through their expression levels, changes in cellular localization and by protein-protein interactions. Integrin-mediated cell adhesion promotes tyrosine phosphorylation of the adaptor p130Cas, which provides binding sites for the SH2 domains of SHIP (Nojima et al., 1995; Prasad et al., 2001). p130Cas thereby links SHIP to the cytoskeleton and creates a context which somehow prevents Akt stimulation by active Rac1. In suspended cells, Akt is no longer activated by integrins and its activity drops. Cell detachment is associated with p130cas dephosphorylation and subsequent SHIP detachment (Nojima et al., 1995) an event that could release its inhibitory effect on the Rac → Akt pathway. In agreement with this, we observed that a significant fraction of SHIP relocated to the cytosol in suspended cells. Signals provided by exogenously expressed active Rac1 (this paper) or physiologically by soluble factors (Soga et al., 2001b) might subsequently relay integrin signals in Akt activation and maintain cell survival in loosely adherent cells.

***Résultats-Discussion : Première Partie «L'activité de la protéine kinase Akt est contrôlée par la GTPase Rac et la phosphatase SHIP en conditions non adhérentes.»***

Supporting this scenario, we show that Rac1 and Akt are found associated in a complex in suspended cells but not in adherent cells. Apart from their cellular expression pattern, no functional difference between the two forms has been reported, suggesting that SHIP2 likely fulfills the role of SHIP in the regulation of a Rac → Akt pathway in non-hematopoietic cells.

Both Rac1 and Akt are present in their active form in the complex and several hypotheses can be put forward regarding the molecular mechanism by which Akt is activated by V12Rac1. We previously established that the PH domain of Akt is required for Rac1-mediated Akt activation (Genot et al., 2000). This domain is essential for targeting Akt to the plasma membrane where activating phospholipids are generated and phosphorylations by upstream kinases occur. Our co-immunoprecipitation experiments performed with a PII domain deletion mutant established that this domain is essential for the molecular association of the Rac1-Akt complex. PH domains have been shown to bind molecules other than phospholipids: in particular, Rac1 has been shown to bind and thereby activate PLCβ2 through binding to its PII domain (Snyder et al., 2003). Furthermore, the Akt PII domain is instrumental in T cell-mediated, PI3K-dependent Akt activation, where phosphorylation and activation occur through oligomerization of T cell (Laine et al., 2000). Interestingly, Rac1 has also been shown to oligodimerize (Zhang et al., 2001) and Rac2 to dimerize (Zhang and Zheng, 1998) under certain conditions. Rac1 has also been shown to be a substrate for Akt (Kwon et al., 2000), indicating that a direct interaction between these two proteins is possible.

A second and equally plausible mechanism directly involves PI3K. Multiple isoforms of PI3K exist but the forms biochemically linked to lymphocyte and/or Akt activation are the class I PI3Ks (Arcaro et al., 2002). Members of this class contain distinct regulatory (p85) and catalytic (p110) subunits. In many cells, Ras can regulate Akt through its interaction with

***Résultats-Discussion : Première Partie «L'activité de la protéine kinase Akt est contrôlée par la GTPase Rac et la phosphatase SHIP en conditions non adhérentes.»***

p110, leading to catalytic activation and subsequent Akt stimulation. In lymphocytes, where Ras is unable to stimulate Akt activity (Genot et al., 2000), Rac1-mediated Akt activation (Genot et al., 2000) and the association of Rac1 with Akt (this paper) are also sensitive to PI3K inhibition, showing that PI3K couples Rac1 to Akt. Although no evidence for a molecular interaction between Rac1 and p110 has been provided to date, PI3K can be co-precipitated with active Rac1 from intact cells (Bokoch et al., 1996; Toliás et al., 1995). The p85 regulatory subunit exhibits a bcr homology domain that may provide the structural basis for the interaction between Rac1 and PI3K. Interestingly, active Rac1 was reported to increase PI3K activity *in vitro* (Bokoch et al., 1996). Experiments aiming at determining the exact role of p85 in the coupling of Rac1 to Akt are now in progress.

PI3K and Akt have already been found to be involved with PIKE, another GTPase. Whereas PIKE-A has been shown to bind and activate Akt, another form of PIKE, PIKE-L, also binds p85 and upregulates its activity (Ye et al., 2000). These interactions are tightly regulated through phospholipids binding to the Akt PH domain (Hu et al., 2005).

Tension exerted on the cytoskeleton has been shown to contribute to the regulation of signal transduction molecules (Sawada and Sheetz, 2002). For instance, a specific binding site for active Rac1 has been demonstrated in the membranes of adherent cells and is required for efficient coupling of active Rac1 to its effector Pak (del Pozo et al., 2004). These sites are lost when cells are detached and GTP-bound Rac1 remains in the cytoplasm in a complex with RhoGDI. We now provide evidence that Rac1 can regulate signaling pathways in suspended cells, as a soluble active Rac1 mutant was found to be a better inducer than the membrane bound active GTPase. Future studies will examine the subcellular localization of the Rac1-Akt complex and determine how RhoGDI can be displaced to allow Rac1 effector activation.

***Résultats-Discussion : Première Partie «L'activité de la protéine kinase Akt est contrôlée par la GTPase Rac et la phosphatase SHIP en conditions non adhérentes.»***

Of note is that Rac1b, a tumor-associated, constitutively active Rac1 splice variant, does not bind RhoGDI but regulates Akt activity efficiently (Singh et al., 2004).

Our findings show that both Rac1 and Rac2 can regulate this alternative pathway. Rac2, whose expression is restricted to the hematopoietic lineage, may play a specific role in Akt activation in the immune system. A requirement for Rac2 in Akt activation has been shown in response to high affinity receptor for IgE (FcεR1) triggering, in mast cells (Djouder et al., 2001). In line with this finding are the results obtained by genetic approaches. In hematopoietic stem progenitor cells and mast cells isolated from these Rac2<sup>-/-</sup> mice, Akt stimulation in response to growth factors is impaired (Yang et al., 2000) (Gu et al., 2003).

In conclusion, these findings demonstrate the existence of another mode of regulation of the survival kinase Akt controlled by Rac. The formation of a complex between Rac1 and Akt occurs only in suspended cells and requires PI3K activity. Rac1 physically associates with Akt and is necessary for its activation in suspended cells through a mechanism that is presently under investigation in the laboratory.

#### **ACKNOWLEDGMENTS**

We thank Drs. P. Parker (Cancer research UK, London, UK), P. Hawkins (The Inositol Laboratory, The Babraham Institute, Cambridge, UK), A. Vazquez (INSERM U542, Villejuif, France) and N. Varin (U363 INSERM, Paris, France) for cell lines, Dr. B. Hennings (Friedrich Miescher Institute for Biomedical Research, Basel, Switzerland) for CTMP antibodies, Dr. G. Gacon (INSERM U567/CNRS UMR8104/Université Paris V, Paris, France) and A. Hall (UCL, London, UK) for Rac encoding plasmids, Dr. B. Burgering

***Résultats-Discussion : Première Partie «L'activité de la protéine kinase Akt est contrôlée par la GTPase Rac et la phosphatase SHIP en conditions non adhérentes.»***

(Dpt of Physiological Chemistry, Centre for Biomedical Genetics, University Medical Center Utrecht, Utrecht, The Netherlands) for PTEN constructs and Dr Kurosaki (Dpt of genetics, Kansai Medical University, Japan) for the SHIP-encoding plasmid.

This work was supported by research grants from the Institute National de la Santé et de la Recherche Médicale, University of Bordeaux2, "Fondation de France" and "Fondation contre la leucémie". BC is a recipient of a fellowship from the "Délégation Générale pour l'Armement" and G.A. from the French Ministry of Education, Research and Technology.

**FIGURE LEGENDS**

**Figure 1: Both Rac1 and Rac2 can regulate Akt activity.** Jurkat cells were co-transfected with plasmids encoding HA-Akt together with either empty vector (control), myc-I.61Rac1 or myc-I.61Rac2. Cells were allowed to recover from the transfection procedure and to express the constructs overnight. Cells were then harvested and subjected to kinase assay using H2B as a substrate. Results were normalized for Akt expression, quantitated and are presented as fold increase of basal activity (one representative experiment). (B) Cells were transfected as in A, and 18 h later, samples were lysed, subjected to western blot and probed for Akt phosphorylation status using phospho-specific antibodies (one representative experiment). For each experiment, results were normalized for Akt expression and quantitated. The band of lowest intensity (control) was arbitrarily taken as one and results are presented as fold increase of this basal response.

**Figure 2: Lack of PTEN in Jurkat cells does not promote Rac1-induced Akt stimulation.** (A) Jurkat cells were co-transfected with plasmids encoding HA-Akt together with either empty vector, wt PTEN or PTEN mutants, in presence or absence of myc-V12Rac1. Eighteen

***Résultats-Discussion : Première Partie «L'activité de la protéine kinase Akt est contrôlée par la GTPase Rac et la phosphatase SHIP en conditions non adhérentes.»***

hours after transfection, cell samples were harvested, lysed, subjected to western blotting and probed for Akt kinase activity as above. Blots were also exposed to films for a longer period of time in order to detect low intensity bands. Results were normalized for Akt expression and quantitated. The band measuring the control response (empty vector) was arbitrarily taken as one and results are presented as fold increase of this response when V12Rac is expressed. (B) Cells were transfected as in A, and 18 h later, samples were lysed, subjected to western blot and probed for Akt phosphorylation status using phospho-specific antibodies. (C) UMUC3 cells were transfected with HA-Akt together with empty vector, V12Rac or rCID2p110 encoding plasmids and assayed as in A. Results were quantitated and are presented as in A.

**Figure 3: Lack of SHIP promotes Rac1-induced Akt stimulation.** DT40 wild type (wt) or SHIP-deficient (SHIP<sup>-/-</sup>) cells were co-transfected with HA-Akt and either empty vector (control) or myc-V12Rac. Eighteen hours after transfection, samples were harvested and split in two sets. (A) In the first set, samples were subjected to Akt kinase activity assay as above. (B) In the second set, samples were lysed, subjected to western blot and probed for Akt phosphorylation status as above. Results were quantitated and normalized for Akt expression. For each phosphorylation site, the band of lowest intensity was arbitrarily taken as one and results are presented as fold increase of this basal response.

**Figure 4: Active Rac selectively stimulates Akt activity in non-adherent cells.** Cells from various cell lines were transfected with HA-Akt together with either empty vector (control), or myc-V12Rac. Eighteen hours after transfection, samples were harvested, lysed, subjected to western blot, probed for Akt phosphorylation status as above. (B) RBL-2H3 cells were transfected with HA-Akt together with either empty vector (control), or myc-V12Rac. Cells were then split in two sets that were further cultured according to the adherent and non-

***Résultats-Discussion : Première Partie «L'activité de la protéine kinase Akt est contrôlée par la GTPase Rac et la phosphatase SHIP en conditions non adhérentes.»***

adherent protocols. Eighteen hours later, cells were harvested and processed for western blotting and analyzed as above. Results were quantitated and normalized for Akt expression. For each phosphorylation site, the band of lowest intensity was arbitrarily taken as one and results are presented as fold increase of this basal response.

**Figure 5: Rac stimulates Akt activity in suspended cells, regardless of their cell lineage.**

V12Rac-PAE cells were transfected with HA-Akt and plated onto tissue culture treated dishes to allow cells to recover from the transfection procedure. Cells were then induced or not, to express V12Rac by adding 0.1 mM IPTG for 6 h. Next, cells were detached and split into two sets that were further cultured according to the adherent and non-adherent protocol. Six hours later, cells were harvested and processed for kinase assay (A) or western blot (B), as above. Results were quantitated and normalized for Akt expression. For each phosphorylation site, the band of lowest intensity was arbitrarily taken as one and results are presented as fold increase of this basal response.

**Figure 6: Both adhesion and SHIP antagonize the activation of Akt by Rac1.**

DT40 wild type (wt) or SHIP-deficient (SHIP<sup>-/-</sup>) cells were co-transfected with HA-Akt and either empty vector (control) or myc-V12Rac. Eighteen hours after transfection, samples were harvested and split into two sets that were further cultured according to the adherent and non-adherent protocol. 3 h later, cells were harvested and processed for western blot and probed for Akt phosphorylation status as above. Blots were also exposed to films for a longer period of time in order to detect low intensity bands in wild type DT40 cells. Results were quantitated and normalized for Akt expression. For each phosphorylation site, the band measuring the control response (empty vector) was arbitrarily taken as one and results are presented as fold increase of this response when V12Rac is expressed. (B) DT40 wild type (wt) or SHIP deficient

***Résultats-Discussion : Première Partie «L'activité de la protéine kinase Akt est contrôlée par la GTPase Rac et la phosphatase SHIP en conditions non adhérentes.»***

(SHIP<sup>-/-</sup>) cells were either lysed to prepare whole cell lysates or subjected to a fractionation protocol. Samples were analyzed for their SHIP content by western blot and band intensities were quantitated. The SHIP content in the cytosol of non adherent cells is presented as fold increase of the SHIP content in the cytosol of adherent cells, arbitrarily taken as one. (C) DT40 wild type (wt) or SHIP-deficient (SHIP<sup>-/-</sup>) cells were lysed and analyzed for basal Rac activity by selective precipitation of GTP-bound Rac using the pull down assay. Band intensities were quantitated. The Rac-GTP/total Rac ratio is presented as fold increase of the control response measured in adherent cells and arbitrarily taken as one.

**Figure 7: The association of Rac and Akt in a complex is dependent on Rac activation status, the presence of an intact PII domain, functional PI3K and is negatively regulated by adhesion.** (A) Jurkat were transfected with IIA-Akt together with a vector encoding either wild type or V12Rac1 and allowed to express the constructs overnight. Cells were then harvested and subjected to co-immunoprecipitation as described in materials and methods. (C) V12Rac-PAE cells were plated on tissue culture treated dishes to allow cells to recover from the transfection procedure. Cells were then induced or not, to express V12Rac1 by adding 0.1 mM IPTG for 6 h. Next, cells were detached and split into two sets that were further cultured according to the adherent and non-adherent protocol. Six hours later, cells were harvested, lysed, subjected to immunoprecipitation using anti Akt or anti-Rac antibodies, then processed for western blot as above. (D) PAE and V12Rac1 PAE cells were plated onto culture dishes (adherent condition) or bacterial dishes (non-adherent condition) in presence of 0,1mM of IPTG and in the presence or absence of 10  $\mu$ M Akt Inhibitor. Cells were collected at 24h and apoptosis was quantitated by FACS, after AnnexinV-FITC staining.

**Figure 8: Rac does not require membrane association to stimulate Akt in suspended cells.** Jurkat cells were co-transfected with plasmids encoding HA-Akt together with either empty vector (control), myc-V12Rac1 or myc-V12RacS189. On the next day, cells were then harvested and lysed, subjected to western blot and probed for Akt phosphorylation status as above. In each case, results were normalized for Akt expression and quantitated. The band of lowest intensity (control) was arbitrarily taken as one and results are presented as fold increase of this basal response when the Rac mutant is expressed.

**Figure 9:** Model of Rac-stimulated Akt activation in non-adherent cells. Details of the model are discussed in the text. Our results point to a role for SHIP in the switch of the Rac → Akt pathway in non-adherent cells.

## MATERIALS AND METHODS

**Cells and transfections:** JHM1, a subline of the human T acute lymphocytic lymphoma cell line Jurkat, and the human U937 monocyte cell line were maintained in RPMI supplemented with penicillin and streptomycin (Gibco, BRL), with 10 % heat inactivated FCS (Globepharm), at 37°C under 5% CO<sub>2</sub>. The avian lymphoma cell lines DT40 (wild type and SHIP <sup>-/-</sup>) were obtained from Riken Bioresource Center Cell Bank (Japan) and were maintained in the same medium supplemented with 1% chicken serum and 50 µM β-mercaptoethanol. The PAE cell lines were maintained in Ham F12 medium supplemented with 10% of FCS and the V12Rac-PAE established cell line was maintained in the same medium supplemented with hygromycin and puromycin. The RBL-2H3 rat basophil and UMUC3 bladder carcinoma cell lines were maintained in DMEM medium supplemented by 10% FCS. For suspension cultures, 10<sup>7</sup> cells cultured in F12 containing 0.2%BSA were plated onto 15cm bacterial dishes coated with 10 mg/ml heat denaturated BSA (Del Pozo et al.,

***Résultats-Discussion : Première Partie*** «L'activité de la protéine kinase Akt est contrôlée par la GTPase Rac et la phosphatase SHIP en conditions non adhérentes.»

2002). Cells were transfected via electroporation (Gene pulser; Bio-Rad) (Genot et al., 2000). Briefly, cells were pulsed in serum-free medium under conditions optimized for each cell line (between 250 to 310 V and 900 to 960  $\mu$ F) except UMUC-3, which was transfected using lipofectamine (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. The amounts of DNA transfected in each experiment were kept constant by adding empty vector.

**Reagents and antibodies.** Reagents were from Sigma. Antibodies 12CA5 (anti-HA-tag) and 9E10 (anti-myc-tag) were a kind gift from Dr Doreen Cantrell. Antibodies against Akt and PTEN were from Santa-Cruz Biotechnology. Antibodies against phospho-Akt 308 and 473 were from Cell Signaling Technology and antibodies against Rac1 and SHIP were from Upstate Biotechnology. Peroxidase-labeled antibodies used in the Western blotting protocol were from Amersham International (Buckinghamshire, UK). LY294002 was from Calbiochem. H2B was from Boehringer Mannheim. Secondary antibodies were obtained from DAKO Cytomation.

**Plasmids and reporter constructs.** Plasmids pSG5 HA-wtAkt, pcDNA3 EE-T308A Akt, pSG5 HA-S473A-Akt and pSG5 HA- $\Delta$ PH, pRK5 myc-tagged-V12Rac or wtRac and the chimera construct of PI3K, pEFrCD2p110 have been described previously (Genot et al., 2000). PTEN constructs were kindly provided by B. Burgering, L61Rac2 by G. Gacon, and SHIP by Dr Kurosaki (Dpt of genetics, Kansai Medical University, Japan). All plasmids were purified by equilibrium centrifugation in CsCl/ethidium bromide gradients using standard procedures.

**Kinase assays and Western Blot analysis.** For Akt kinase assays, cells were transfected with an HA-tagged version of wtAkt together with various expression plasmids. Eighteen hours after transfection, cells were harvested and equivalent numbers of living cells were subjected to immunoprecipitation using 12CA5 antibodies as previously described. The kinase reaction was performed using H2B as a substrate in the presence of [ $\gamma$ - $^{32}$ P]ATP. After incubation at

***Résultats-Discussion : Première Partie «L'activité de la protéine kinase Akt est contrôlée par la GTPase Rac et la phosphatase SHIP en conditions non adhérentes.»***

room temperature for 30 min, the reaction was stopped with Laemmli sample buffer and kinase reaction products were analyzed on a 15 % SDS-PAGE. The lower half of the gel was dried down and <sup>32</sup>P-incorporation into H2B was quantitated using a phosphorImager (Molecular Dynamics). The upper part of the gel containing immunoprecipitated tagged-protein kinase was transferred onto PVDF membranes (Immobilon, Millipore). Membranes were 'blocked' in PBS/0.05 % Tween 20, plus 5% milk (5% BSA for phosphospecific antibodies) for 2 h. Appropriate dilutions of the relevant antibodies were incubated with the membrane overnight at 4°C. After extensive washing, membranes were incubated with the second antibody for 1 hr at room temperature. Membrane-bound antibodies were visualized by autoradiography using ECL Western -blotting detection reagents (Amersham) and Kodak XSI films. The amount of Akt detected on Western Blot was determined by scanning the autoradiography followed by processing of the data with the Adobe Photoshop program. H2B phosphorylation was normalized for the amount of HA-Akt in each sample and thus expressed as fold increase of the control activity. To assess protein expression from the transfected plasmid, proteins were acetone-precipitated from supernatants of immunoprecipitates for 1 h at -20°C, pelleted and resuspended in reducing Laemmli sample buffer. After separation by SDS-PAGE, proteins were transferred to PVDF membranes followed by western blotting as described above.

**Co-immunoprecipitation assays.** Protein association was analyzed in cells transiently transfected with expression vectors for Rac and Akt in the relevant cells. Cells were washed 24 h after transfection in cold PBS before lysis 30 min at 4°C in a buffer containing 20 mM TRIS buffer (pH 7.5), 2 mM EDTA (pH 8.3), 150 mM NaCl, 0.5% Brij97, 10 mM NaF, 2 mM sodium orthovanadate, 0.5 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 5 mg/ml leupeptin and pepstatin. Lysates were clarified by centrifugation at 14 000g for 10 min before incubation of the supernatant with antibody (as indicated in the figure legends) in a total volume of 0.5 ml

***Résultats-Discussion : Première Partie «L'activité de la protéine kinase Akt est contrôlée par la GTPase Rac et la phosphatase SHIP en conditions non adhérentes.»***

for 1 h at 4 °C under agitation. Lysates were then incubated with protein G agarose for an additional hour at 4 °C. The immunoprecipitates/protein G-agarose beads were washed 4 times with lysis buffer and bound proteins were eluted in protein sample buffer, resolved by SDS-PAGE and analyzed by western blotting.

**Rac activity assay**

Rac activity was measured by pull-down assays using GST-Cdc42/Rac-interactive binding domain (CRIB)-PAK (Moreau et al., 2003; Sander et al., 1999). Rac activity was calculated as the ratio of the measured staining intensity of the GTP-Rac band pulled down with the GST-PAK divided by that measured for total Rac.

**Fractionation protocol.** DT40 wt cells ( $1 \times 10^7$ ) were plated on tissue culture-coated dishes (adherent culture conditions) or bacterial (non-adherent culture conditions) dishes for 3 h in low serum (1.5%) at 37°C. Cells were then lysed for 30 min at 4°C in a hypotonic buffer containing 10 mM Tris (pH 7.5), 1.5 mM NaCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT, 2 mM sodium orthovanadate, 0.5 phenyl ethylsulfonyl fluoride, 5 mg/ml leupeptin and pepstatin. Lysates were homogenized by passing them 15 times through a 23G needle and centrifuged at 14000g for 30 min. Supernatant (cytosolic fraction) was resolved by SDS-PAGE and SHIP expression was analyzed by western blotting.

**Apoptosis assay.** For the apoptosis experiments, equal numbers of PAE and V12Rac PAE cells were plated onto culture dishes (adherent conditions) or bacterial dishes (non-adherent conditions) in presence of 0.1mM IPTG and in the presence or absence of 10 μM Akt Inhibitor. Cells were collected after 24h and apoptosis was detected by labelling cells with AnnexinV-FITC and Propidium Iodide for 30 min in the dark at room temperature. Apoptosis was quantitated by flow cytometry on an EPICS<sup>®</sup> XL Coulter cytometer equipped with a EXPO32<sup>®</sup> software.

***Résultats-Discussion : Première Partie «L'activité de la protéine kinase Akt est contrôlée par la GTPase Rac et la phosphatase SHIP en conditions non adhérentes.»***

**Statistics.** Quantification values represent the mean of 3 independent experiments +/- SD.

Significance was determined using the Student's t test (\* P≤0.05).

**REFERENCES**

- Arcaro, A., U.K. Khanzadi, B. Vanhaesebroeck, T.D. Terley, M.D. Waterfield, and M.J. Seckl. 2002. Two distinct phosphoinositide 3-kinases mediate polypeptide growth factor-stimulated PKB activation. *Embo J.* 21:5097-108.
- Astoul, E., C. Edmunds, D.A. Cantrell, and S.G. Ward. 2001. PI 3-K and T-cell activation: limitations of T-leukemic cell lines as signaling models. *Trends Immunol.* 22:190-6.
- Bokoch, G.M., C.J. Vlahos, Y. Wang, U.G. Knaus, and A.E. Traynor-Kaplan. 1996. Rac GTPase interacts specifically with phosphatidylinositol 3-kinase. *Biochem J.* 315 ( Pt 3):775-9.
- Cheng, T.L., M. Symons, and T.S. Jou. 2004. Regulation of anoikis by Cdc42 and Rac1. *Exp Cell Res.* 295:497-511.
- Couglis, S.J., T.S. Jou, and M. Symons. 2001. Rac1 protects epithelial cells against anoikis. *J Biol Chem.* 276:28113-20.
- del Pozo, M.A., N.B. Alderson, W.B. Kiesses, H.H. Chiang, R.G. Anderson, and M.A. Schwartz. 2004. Integrins regulate Rac targeting by internalization of membrane domains. *Science.* 303:839-42.
- Del Pozo, M.A., W.B. Kiesses, N.B. Alderson, N. Meller, K.M. Hahn, and M.A. Schwartz. 2002. Integrins regulate GTP-Rac localized effector interactions through dissociation of Rho-GDI. *Nat Cell Biol.* 4:232-9.
- Djouflet, N., G. Schmidt, M. Frings, A. Cavalié, M. Thelen, and K. Aktories. 2001. Rac and phosphatidylinositol 3-kinase regulate the protein kinase B in the epsilon RI signaling in R11, 2H3 mast cells. *J Immunol.* 166:1627-34.
- Downward, J. 2004. PI 3-kinase, Akt and cell survival. *Semin Cell Dev Biol.* 15:177-82.
- Du, K., and P.N. Tsichlis. 2005. Regulation of the Akt kinase by interacting proteins. *Oncogene.* 24:7401-9.
- Feng, J., J. Park, P. Cron, D. Hess, and B.A. Hunninges. 2004. Identification of a PKB/Akt hydrophobic motif Ser-473 kinase as DNA-dependent protein kinase. *J Biol Chem.* 279:41189-96.
- Frechum, R.W., K.L. Wright, S.J. Burgess, E. Astoul, D.A. Cantrell, and S.G. Ward. 2002. Evidence that SHIP-1 contributes to phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate metabolism in T lymphocytes and can regulate novel phosphoinositide 3-kinase effectors. *J Immunol.* 169:5441-50.
- Frisch, S.M., and E. Ruoslahti. 1997. Integrins and anoikis. *Curr Opin Cell Biol.* 9:701-6.
- Genot, E.M., C. Arntzmerlou, G. Ku, B.M. Burgering, A. Weiss, and I.M. Kramer. 2000. The T-cell receptor regulates Akt (protein kinase B) via a pathway involving Rac1 and phosphatidylinositide 3-kinase. *Mol Cell Biol.* 20:5469-73.
- Grodzki, A.C., M.V. Pastor, J.F. Sousa, C. Oliver, and M.C. Jamar. 2003. Differential expression of integrin subunits on adherent and nonadherent mast cells. *Braz J Med Biol Res.* 36:1101-9.
- Gu, Y., M.D. Filippi, J.A. Cancelas, J.E. Steffing, E.P. Williams, A.C. Jasti, C.E. Harris, A.W. Lee, R. Prabakar, S.J. Atkinson, D.J. Kwiatkowski, and D.A. Williams. 2003. Hematopoietic cell regulation by Rac1 and Rac2 guanine triphosphatases. *Science.* 302:445-9.
- Haas-Kogan, D., N. Shalev, M. Wong, G. Mills, G. Youn, and D. Stokoe. 1993. Protein kinase B (PKB/Akt) activity is elevated in glioblastoma cells due to mutation of the tumor suppressor PTEN/MM1AC. *Curr Biol.* 3:1195-8.

***Résultats-Discussion : Première Partie «L'activité de la protéine kinase Akt est contrôlée par la GTPase Rac et la phosphatase SHIP en conditions non adhérentes.»***

- Dansen, M.D., and W.J. Nelson. 2001. Serum-activated assembly and membrane translocation of an endogenous Rac1 effector complex. *Curr Biol.* 11:356-60.
- Higuchi, M., N. Masuyama, Y. Fukui, A. Suzuki, and Y. Gotoh. 2001. Akt mediates Rac/Cdc42-regulated cell motility in growth factor-stimulated cells and in invasive PTEN knockout cells. *Curr Biol.* 11:1958-62.
- Hu, Y., Z. Liu, and K. Ye. 2005. Phosphoinositol lipids bind to phosphatidylinositol 3 (PI3)-kinase enhancer GTPase and mediate its stimulatory effect on PI3-kinase and Akt signalings. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 102:16853-8.
- Kalesnikoff, J., L.M. Sly, M.R. Hughes, T. Buchse, M.J. Rauh, L.P. Cao, V. Lam, A. Mui, M. Huber, and G. Krystal. 2003. The role of SHIP in cytokine-induced signaling. *Rev Physiol Biochem Pharmacol.* 149:87-103.
- Keely, P.J., J.K. Westwick, I.P. Whitehead, C.J. Der, and L.V. Parise. 1997. Cdc42 and Rac1 induce integrin-mediated cell motility and invasiveness through PI3K. *Nature.* 390:632-6.
- Kim, D., S. Kim, H. Koh, S.O. Yoon, A.S. Chung, K.S. Cho, and J. Chung. 2001. Akt/PKB promotes cancer cell invasion via increased motility and metalloproteinase production. *FASEB J.* 15:1953-62.
- Komander, D., A. Fairservice, M. Deak, G.S. Kular, A.R. Prescott, C. Peter Downes, S.T. Salfany, D.R. Alessi, and D.M. van Aalten. 2004. Structural insights into the regulation of PDK1 by phosphoinositides and inositol phosphates. *EMBO J.* 23:3918-28.
- Krystal, G. 2000. Lipid phosphatases in the immune system. *Semin Immunol.* 12:397-403.
- Kwon, T., D.Y. Kwon, J. Chun, J.H. Kim, and S.S. Kang. 2000. Akt protein kinase inhibits Rac1-GTP binding through phosphorylation at serine 71 of Rac1. *J Biol Chem.* 275:423-8.
- Laine, J., G. Kinsella, T. Obata, M. Sha, and M. Noguuchi. 2000. The protooncogene TCL1 is an Akt kinase coactivator. *Mol Cell.* 6:395-407.
- Maira, S.M., I. Galeric, D.P. Brazil, S. Kaeber, E. Ingley, M. Thelen, and B.A. Hemmings. 2001. Carboxyl-terminal modulator protein (CTMP), a negative regulator of PI3K/Akt and v-Akt at the plasma membrane. *Science.* 294:374-80.
- Marte, J.M., P. Rodriguez-Viciana, S. Wenström, P.H. Warne, and J. Downward. 1997. R-Ras can activate the phosphoinositide 3-kinase but not the MAP kinase arm of the Ras effector pathways. *Curr Biol.* 7:63-70.
- Moreau, V., F. Tatin, C. Varon, and E. Genot. 2003. Actin can reorganize into podosomes in aortic endothelial cells: a process controlled by Cdc42 and RhoA. *Mol Cell Biol.* 23:6809-22.
- Nishida, K., Y. Kaziro, and T. Satoh. 1999. Anti-apoptotic function of Rac in hematopoietic cells. *Oncogene.* 18:407-15.
- Nojima, Y., N. Morino, T. Minura, K. Hamasaki, H. Furuya, R. Sakai, T. Sato, K. Tachibana, C. Morimoto, Y. Yazaki, and et al. 1995. Integrin-mediated cell adhesion promotes tyrosine phosphorylation of p130Cas, a Src homology 3-containing molecule having multiple Src homology 2-binding motifs. *J Biol Chem.* 270:15398-402.
- Ouo, M., H. Okada, S. Bolland, S. Yanagi, T. Kurosaki, and J.V. Ravetch. 1997. Deletion of SHIP or SHP-1 reveals two distinct pathways for inhibitory signaling. *Cell.* 90:293-301.
- Parekh, D.B., R.M. Katso, N.R. Leslie, C.P. Downes, K.J. Praeyk, M.D. Waterfield, and P.J. Parker. 2000. Beta1-integrin and PTEN control the phosphorylation of protein kinase C. *Biochem J.* 352 Pt 2:425-33.
- Prasad, N., R.S. Topping, and S.J. Decker. 2001. SH2-containing inositol 5'-phosphatase SHIP2 associates with the p130(Cas) adapter protein and regulates cellular adhesion and spreading. *Mol Cell Biol.* 21:1416-28.
- Qui, R.G., J. Chun, D. Kim, F. McCormick, and M. Symons. 1995. An essential role for Rac in Ras transformation. *Nature.* 374:457-9.
- Reif, K., C.D. Nobes, G. Thomas, A. Hall, and D.A. Cantrell. 1996. Phosphatidylinositol 3-kinase signals activate a selective subset of Rac/Rho-dependent effector pathways. *Curr Biol.* 6:1445-55.
- Ruoslahti, E., and J.C. Reed. 1994. Anchorage dependence, integrins, and apoptosis. *Cell.* 77:177-8.

***Résultats-Discussion : Première Partie «L'activité de la protéine kinase Akt est contrôlée par la GTPase Rac et la phosphatase SHIP en conditions non adhérentes.»***

- Sander, E.E., J.P. ten Klooster, S. van Delft, R.A. van der Kammen, and J.G. Collard. 1999. Rac downregulates Rho activity: reciprocal balance between both GTPases determines cellular morphology and migratory behavior. *J Cell Biol.* 147:1009-22.
- Sawada, Y., and M.P. Sheetz. 2002. Force transduction by Triton cytoskeletons. *J Cell Biol.* 156:609-15.
- Singh, A., A.H. Kamnoub, T.R. Palmby, E. Lengyel, J. Sondck, and C.J. Der. 2004. Rac1b, a tumor associated, constitutively active Rac1 splice variant, promotes cellular transformation. *Oncogene.* 23:9369-80.
- Sly, L.M., M.J. Raub, J. Kalesnikoff, T. Buchse, and G. Krystal. 2003. SHIP, SHIP2, and PTEN activities are regulated in vivo by modulation of their protein levels: SHIP is up-regulated in macrophages and mast cells by lipopolysaccharide. *Exp Hematol.* 31:1170-81.
- Snyder, J.T., A.U. Singer, M.R. Wing, T.K. Harden, and J. Sondck. 2003. The pleckstrin homology domain of phospholipase C-beta2 as an effector site for Rac. *J Biol Chem.* 278:21099-104.
- Soga, N., J.O. Connolly, M. Chellaiab, J. Kawamura, and K.A. Hruska. 2001a. Rac regulates vascular endothelial growth factor stimulated motility. *Cell Commun. Adhes.* 8:1-13.
- Soga, N., N. Namba, S. McAllister, L. Cornelius, S.L. Teitelbaum, S.F. Dowdy, J. Kawamura, and K.A. Hruska. 2001b. Rho family GTPases regulate VEGF-stimulated endothelial cell motility. *Exp Cell Res.* 269:73-87.
- Song, J., S. Salek-Ardakani, P.R. Rogers, M. Cheng, L. Van Parijs, and M. Croll. 2004. The costimulation-regulated duration of PKB activation controls T cell longevity. *Nat Immunol.* 5:150-3.
- Staal, S.P. 1987. Molecular cloning of the akt oncogene and its human homologues AKT1 and AKT2: amplification of AKT1 in a primary human gastric adenocarcinoma. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 84:5034-7.
- Stambolie, V., A. Suzuki, J.L. de la Pompa, G.M. Brothers, C. Mitsos, T. Sasaki, J. Rutland, J.M. Penninger, D.P. Siderovski, and T.W. Mak. 1998. Negative regulation of PKB/Akt-dependent cell survival by the tumor suppressor PTEN. *Cell.* 95:29-39.
- Suzuki, A., J.L. de la Pompa, V. Stambolie, A.J. Elia, T. Sasaki, I. del Barco Barrantes, A. Ho, A. Wakchan, A. Ilic, W. Khoo, M. Fukumoto, and T.W. Mak. 1998. High cancer susceptibility and embryonic lethality associated with mutation of the PTEN tumor suppressor gene in mice. *Curr Biol.* 8:1169-78.
- Thomas, C.C., M. Deak, D.R. Alessi, and D.M. van Aalten. 2002. High-resolution structure of the pleckstrin homology domain of protein kinase B/akt bound to phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate. *Curr Biol.* 12:1256-62.
- Toker, A., and A.C. Newton. 2009. Akt/protein kinase B is regulated by autophosphorylation at the hypothetical PDK-2 site. *J Biol Chem.* 275:8271-1.
- Tolias, K.F., L.C. Cantley, and C.L. Carpenter. 1995. Rho family GTPases bind to phosphoinositide kinases. *J Biol Chem.* 270:17656-9.
- Troussard, A.A., N.M. Mawji, C. Ong, A. Mui, R. St-Arnaud, and S. Dectur. 2003. Conditional knock-out of integrin-linked kinase demonstrates an essential role in protein kinase B/Akt activation. *J Biol Chem.* 278:22374-8.
- Tu, S., W.J. Wu, J. Wang, and R.A. Cerione. 2003. Epidermal growth factor-dependent regulation of Cdc42 is mediated by the Src tyrosine kinase. *J Biol Chem.* 278:49293-300.
- Van Heenik, P.H., and P.L. Hordijk. 2005. Rho GTPases in hematopoietic cells. *Antioxid Redox Sign.* 7:1440-55.
- van Weering, D.H., J. de Rooij, B. Marte, J. Downward, J.L. Bos, and B.M. Burgering. 1998. Protein kinase B activation and lamellipodium formation are independent phosphoinositide 3-kinase-mediated events differentially regulated by endogenous Ras. *Mol Cell Biol.* 18:1802-11.
- Ward, S.G., C.H. June, and D. Olive. 1996. PI 3-kinase: a pivotal pathway in T-cell activation? *Immunol Today.* 17:187-97.

***Résultats-Discussion : Première Partie «L'activité de la protéine kinase Akt est contrôlée par la GTPase Rac et la phosphatase SHIP en conditions non adhérentes.»***

- Ward, S.G., S.C. Ley, C. MacPhee, and D.A. Cantrell. 1992. Regulation of D-3 phosphoinositides during T cell activation via the T cell antigen receptor/CD3 complex and CD2 antigens. *Eur J Immunol.* 22:45-9.
- Watton, S.J., and J. Downward. 1999. Akt/PKB localisation and 3' phosphoinositide generation at sites of epithelial cell-matrix and cell-cell interaction. *Curr Biol.* 9:433-6.
- Welch, H., A. Equinoa, L.R. Stephens, and P.T. Hawkins. 1998. Protein kinase B and rac are activated in parallel within a phosphatidylinositol 3OH-kinase-controlled signaling pathway. *J Biol Chem.* 273:11248-56.
- Yamada, K.M., and S. Miyamoto. 1995. Integrin transmembrane signaling and cytoskeletal control. *Curr Opin Cell Biol.* 7:681-9.
- Yang, P.C., R. Kapur, A.J. King, W. Tao, C. Kim, J. Hameo, R. Breese, M. Marshall, M.C. Dintner, and D.A. Williams. 2000. Rac2 stimulates Akt activation affecting BAD/Bcl-XL expression while mediating survival and actin function in primary mast cells. *Immunity.* 12:557-68.
- Ye, K., K.J. Hurl, F.Y. Wu, M. Fang, H.R. Luo, J.J. Hong, S. Blackshaw, C.D. Ferris, and S.H. Snyder. 2000. Pike, A nuclear gpase that enhances PI3kinase activity and is regulated by protein 4.1N. *Cell.* 103:919-30.
- Zhang, B., Y. Gao, S.Y. Moon, Y. Zhang, and Y. Zheng. 2001. Oligomerization of Rac1 gpase mediated by the carboxyl-terminal polybasic domain. *J Biol Chem.* 276:8958-67.
- Zhang, B., and Y. Zheng. 1998. Negative regulation of Rho family GTPases Cdc42 and Rac2 by homodimer formation. *J Biol Chem.* 273:25728-33.

***Résultats-Discussion : Première Partie*** «L'activité de la protéine kinase Akt est contrôlée par la GTPase Rac et la phosphatase SHIP en conditions non adhérentes.»

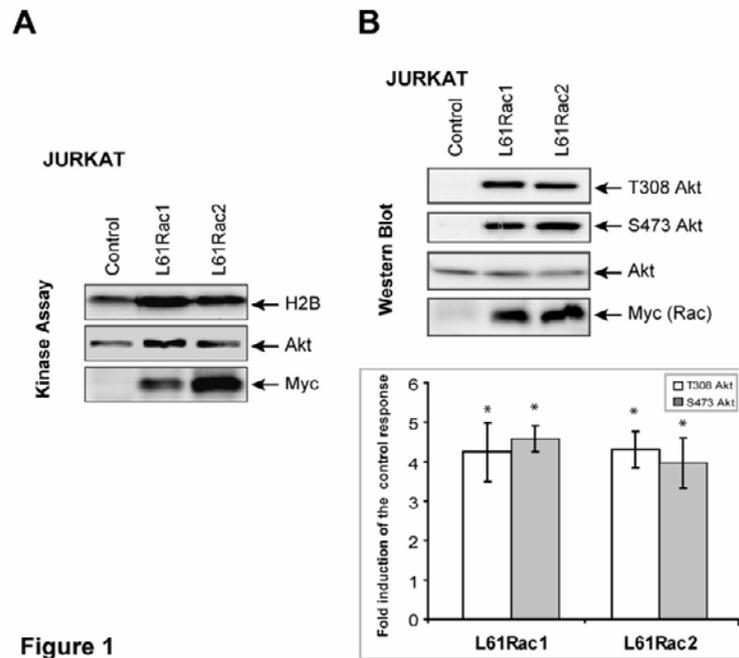
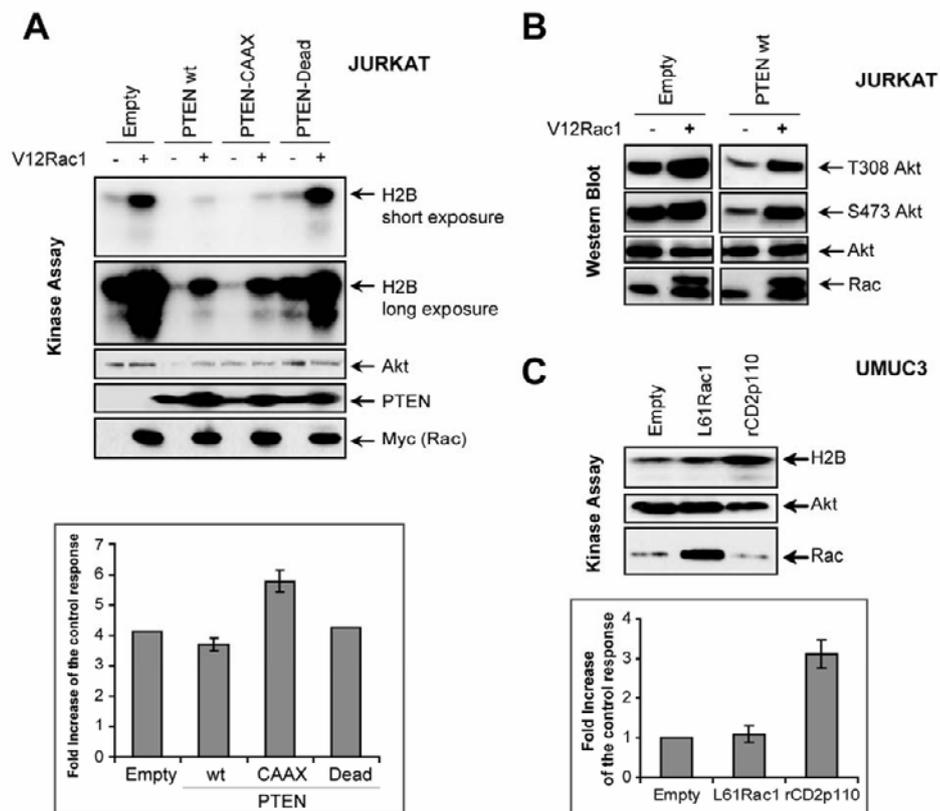
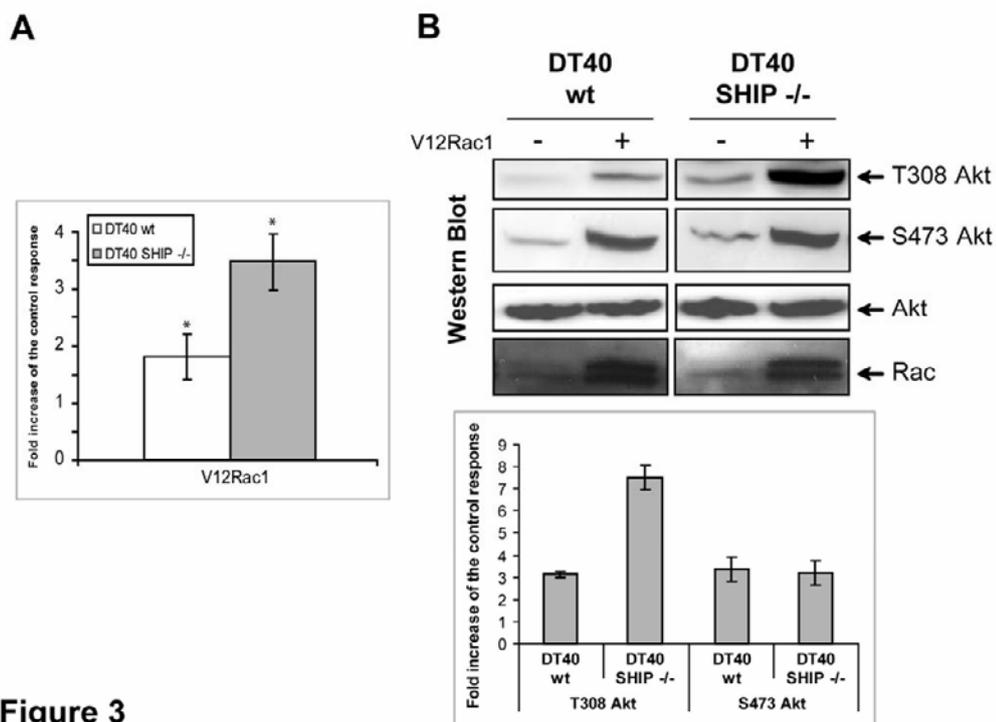


Figure 1

**Résultats-Discussion : Première Partie** «L'activité de la protéine kinase Akt est contrôlée par la GTPase Rac et la phosphatase SHIP en conditions non adhérentes.»

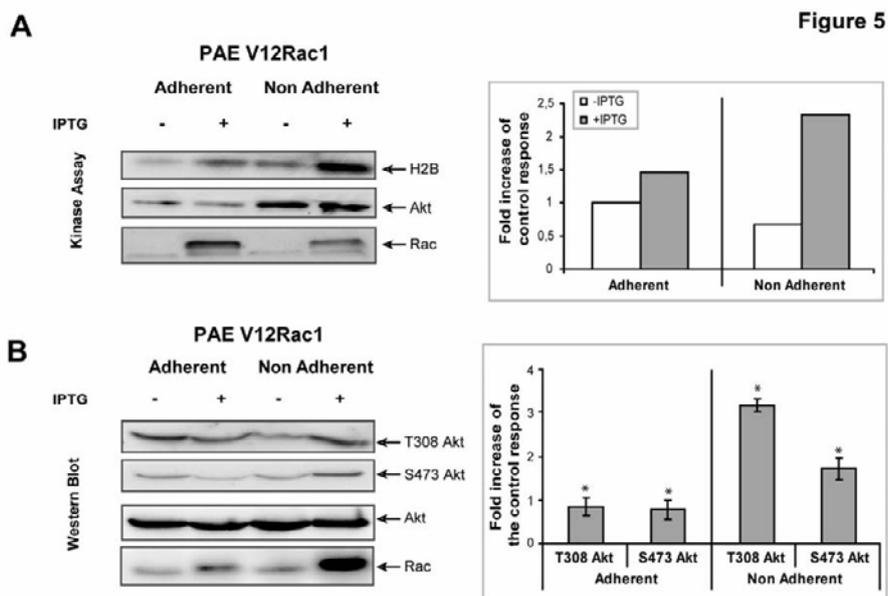
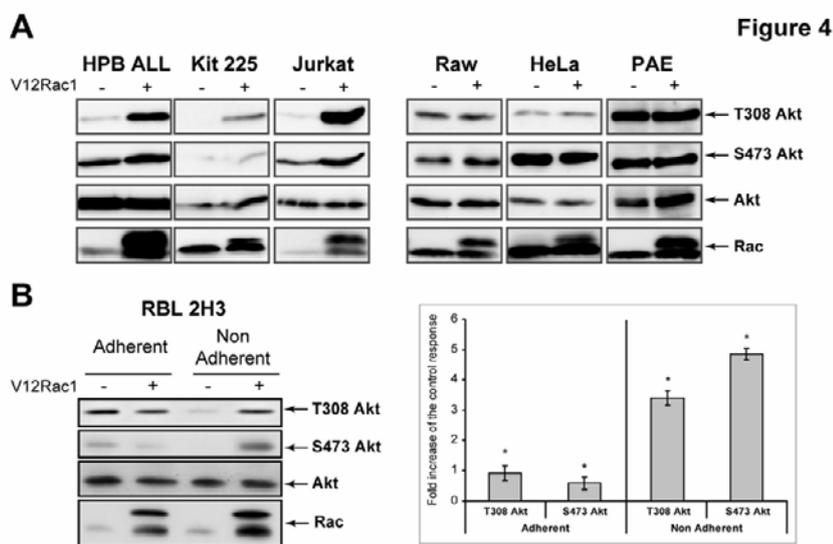


**Figure 2**



**Figure 3**

**Résultats-Discussion : Première Partie** «L'activité de la protéine kinase Akt est contrôlée par la GTPase Rac et la phosphatase SHIP en conditions non adhérentes.»



**Résultats-Discussion : Première Partie** «L'activité de la protéine kinase Akt est contrôlée par la GTPase Rac et la phosphatase SHIP en conditions non adhérentes.»

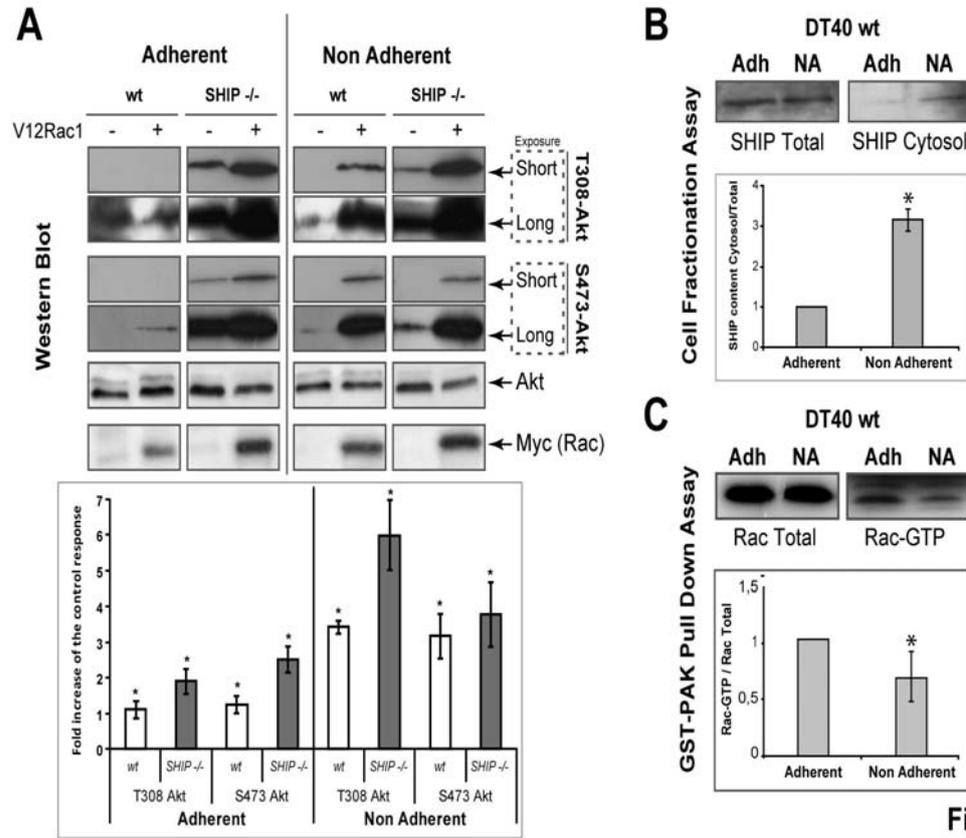


Figure 6

**Résultats-Discussion : Première Partie** «L'activité de la protéine kinase Akt est contrôlée par la GTPase Rac et la phosphatase SHIP en conditions non adhérentes.»

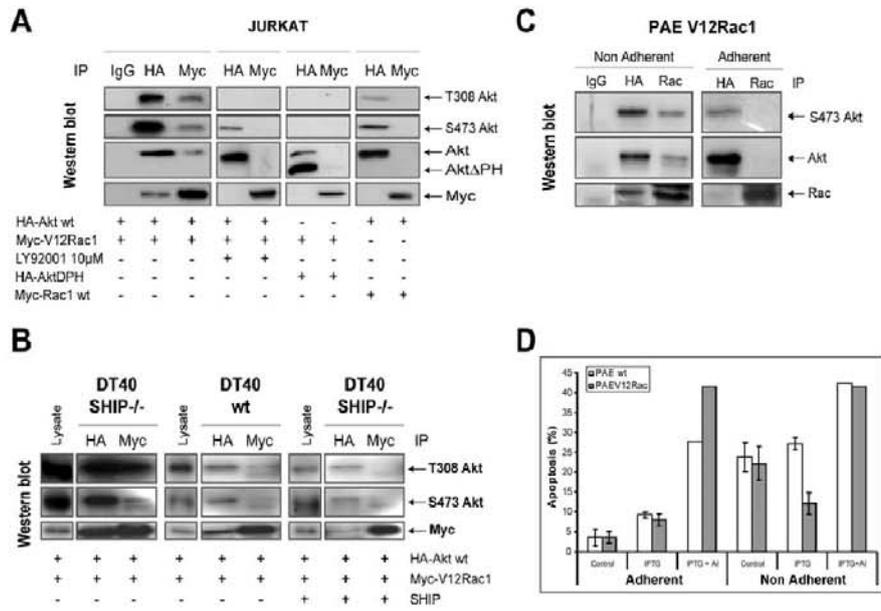


Figure 7

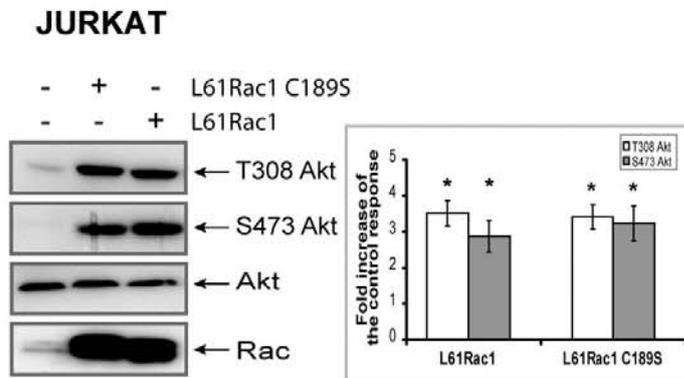
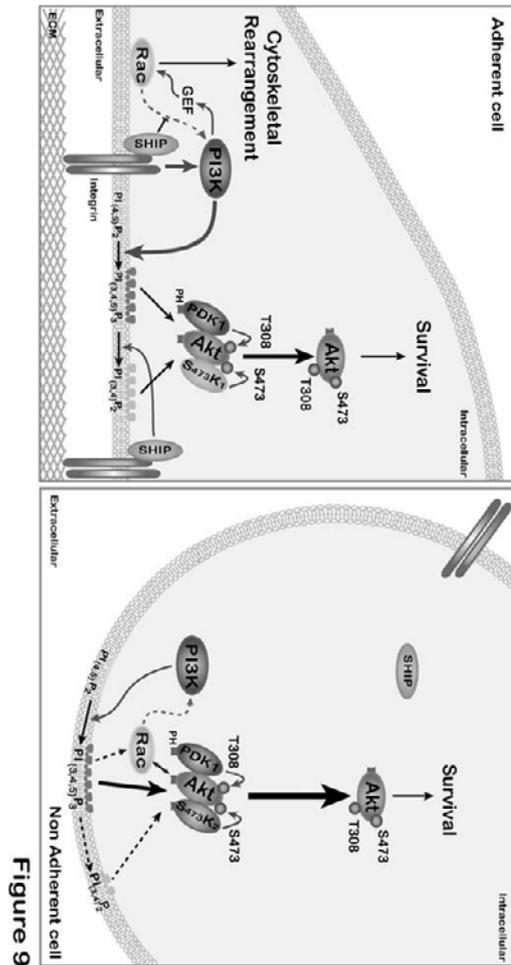


Figure 8

**Résultats-Discussion : Première Partie** «L'activité de la protéine kinase Akt est contrôlée par la GTPase Rac et la phosphatase SHIP en conditions non adhérentes.»



**Figure 9**

**c) Discussion du papier**

La première démonstration de l'existence de la voie « R-P-A » a été faite dans les cellules Jurkat d'origine hématopoïétique. Du fait de l'absence de la protéine PTEN dans ces cellules, il fallait s'assurer que l'activation de cette voie n'était pas due à l'absence de cette protéine.

Nous montrons que PTEN régule le taux basal d'activité d'Akt mais n'interfère pas avec la régulation d'Akt par Rac (même index de stimulation). Nous avons pu montrer que l'absence de PTEN n'était donc pas le facteur responsable de l'activation de cette voie (voir figure 2 de l'article).

Rac2, une isoforme de Rac plus spécifiquement exprimée dans certains compartiments hématopoïétiques, montre le même potentiel que Rac1 dans le processus d'activation d'Akt (voir figure 1 de l'article).

Par ailleurs, nous avons pu mettre en évidence des spécificités de cette voie « R-P-A » : elle n'est pas restreinte aux modèles hématopoïétiques, elle est sous contrôle de SHIP et de l'adhérence, nous mettons en évidence une interaction de Rac et Akt, enfin on montre que Rac peut agir indépendamment de sa localisation aux membranes.

- Voie « R-P-A » non restreinte aux modèles hématopoïétiques :

Premièrement établie dans les cellules Jurkat, nous avons pu montrer que d'autres cellules hématopoïétiques possédaient la voie de signalisation « R-P-A » ; néanmoins seules les cellules en suspension peuvent activer cette voie (voir figure 4 de l'article). Dans un deuxième temps, nous avons pu démontrer que cette voie n'était pas restreinte au modèle hématopoïétique ; par exemple cette voie peut être activée dans des cellules endothéliales, les PAE (Porcine Aortic endothelial cell), une fois que ces cellules sont détachées de leur support (voir figure 5 de l'article).

- SHIP et Adhérence ; régulateurs de la voie « R-P-A » :

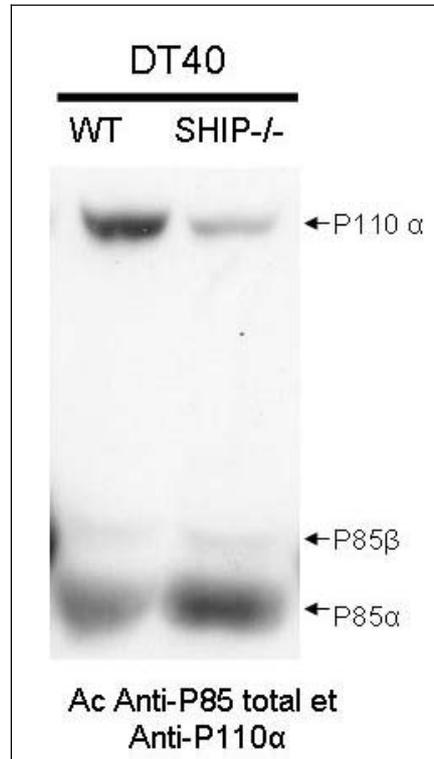
La phosphatase SHIP est une Inositol 5' phosphatase qui contribue à abaisser le niveau cellulaire de PIP3. Les PtdIns(3,4,5)P3 sont transformés en PtdIns(3,4)P2. L'absence de la protéine SHIP dans les cellules DT40 permet d'augmenter l'activation d'Akt par Rac. De plus, nous avons montré que l'absence de SHIP lève l'inhibition exercée par l'adhérence pour l'activation de la voie « R-P-A ». Aussi la localisation de SHIP est régulée par l'adhérence dans ce modèle : dans les cellules en suspension, la fraction cytosolique est

***Résultats-Discussion : Première Partie*** «L'activité de la protéine kinase Akt est contrôlée par la GTPase Rac et la phosphatase SHIP en conditions non adhérentes.»

enrichie en protéines SHIP. La régulation de l'activation de la voie « R-P-A » par le biais de l'adhérence pourrait donc être sous contrôle de la protéine SHIP. Cette protéine agirait comme inhibiteur de la voie dans les cellules adhérentes par sa localisation membranaire.

Nous avons analysé l'expression de la sous-unité catalytique P110 $\alpha$  et des sous-unités régulatrices de la PI3K dans les DT40 WT et DT40 SHIP $^{-/-}$ . Nous avons pu montrer que l'absence de SHIP modifie l'expression des composants de la PI3K. Il y a une diminution de l'expression de P110 $\alpha$  et une augmentation de celle de P85 $\alpha$  ; l'expression de P85 $\beta$ , elle ne semble pas affectée (Figure 24). La diminution de P110 $\alpha$  pourrait être due à un rétrocontrôle exercé par les PIP3: en effet, l'absence de SHIP contribue à maintenir un pool élevé de PIP3, une quantité trop importante de PIP3 pourrait alors avoir un effet inhibiteur sur l'expression de la PI3K. L'observation que P85 $\alpha$  varie à l'opposé de P110 $\alpha$  est intrigante et reste à éclaircir.

Aux vues des variations d'expression de P110 et P85 dans la lignée DT40 SHIP $^{-/-}$ , il serait sûrement préférable de confirmer les effets de SHIP par une approche d'ARN interférents dans des cellules normales, la diminution de l'expression de SHIP ne serait alors que transitoire.



**Figure 24** Analyse du niveau d'expression des sous-unités régulatrices P85 $\alpha$  et P85 $\beta$  et de la sous-unité catalytique P110 $\alpha$  dans les lignées DT40 wr et DT40 SHIP $^{-/-}$ .

**Résultats-Discussion : Première Partie** «L'activité de la protéine kinase Akt est contrôlée par la GTPase Rac et la phosphatase SHIP en conditions non adhérentes.»

- Rac interagit avec Akt :

Nous avons pu mettre en évidence que la protéine Rac peut se lier à Akt. Cette interaction est dépendante du domaine PH d'Akt, et est rendue impossible par l'ajout d'un inhibiteur des PI3K. Deux hypothèses sont alors possibles : soit Rac est un substrat d'Akt, soit Rac est directement un régulateur de l'activité d'Akt.

- **Rac substrat d'Akt :** Rac est décrite comme une cible d'Akt : en effet, cette dernière induit la phosphorylation de Rac et permet l'inhibition de la GTPase (Kwon, Kwon et al. 2000; Zhang, Wang et al. 2006). Dans ce cas, la dépendance du domaine PH pour l'interaction viendrait du fait qu'il faut impérativement une forme active d'Akt pour interagir avec Rac. Le domaine PH, liant les PIP3, étant essentiel à l'activation d'Akt.

- **Rac régulateur d'Akt :**

L'interaction de Rac et d'Akt peut-être envisagée dans le sens où Rac est directement un régulateur d'Akt permettant son activation. Il existe une protéine ArgBP2 qui a la capacité de lier d'une part PAK (effecteur de Rac) et d'autre part Akt (Yuan, Kim et al. 2005). Cette protéine pourrait être le lien entre Akt et Rac. Il pourrait ainsi se former un complexe Rac-PAK-ArgBP2-Akt permettant l'activation d'Akt.

Rac est capable de s'homodimériser et ceci potentialise son effet sur ses effecteurs (Zhang, Gao et al. 2001). Une autre protéine TCL1 est capable de s'homodimériser et dans cet état TCL1 va interagir avec Akt permettant son activation. De plus, tout comme Rac, l'interaction de TCL1 avec Akt dépend du domaine PH d'Akt. Rac pourrait ainsi activer Akt au travers d'un mécanisme similaire à l'activation par TCL1. Afin de tester l'hypothèse qui est que Rac puisse directement activer Akt, il serait intéressant de déterminer les acides aminés dans Akt importants pour son interaction avec Rac. Nous pourrions ainsi vérifier par l'utilisation d'une forme mutée d'Akt que Rac ne peut plus induire d'activation.

- Rac ne dépend pas de sa relocalisation aux membranes pour activer Akt :

Le modèle canonique de l'activation des effecteurs de Rac passe par une relocalisation de la GTPase au niveau membranaire. Une fois à la membrane, Rac peut se lier à ses effecteurs pour les activer. Cette translocation est d'ailleurs sous contrôle des intégrines (Del Pozo, Kiosses et al. 2002; del Pozo, Alderson et al. 2004). En absence de la

***Résultats-Discussion : Première Partie*** «*L'activité de la protéine kinase Akt est contrôlée par la GTPase Rac et la phosphatase SHIP en conditions non adhérentes.*»

signalisation par le biais des intégrines (cas d'une cellule non adhérente) Rac reste cytosolique et ne peut activer ses effecteurs (Del Pozo, Kiosses et al. 2002).

Dans le cadre de la voie « R-P-A » nous montrons que dans des cellules en suspension Rac peut induire l'activation d'Akt alors que cela est impossible dans des cellules normalement adhérentes. Ce mécanisme va donc à l'encontre du modèle défini pour les effecteurs de Rac de type PAK. Le mutant V12RacC189S ne peut plus être modifié par prénylation ; ceci a pour conséquence qu'il ne peut plus se lier aux membranes. L'utilisation de ce mutant nous a permis de démontrer que l'activation d'Akt par Rac était indépendante d'une association de la GTPase aux membranes (voir figure 8).

## **2. Deuxième Partie : Etude de la voie « R-P-A »**

La voie « R-P-A » pour Rac-PI3K-Akt, ne peut être activée que dans un contexte où les cellules sont non adhérentes ; si on prend des cellules normalement adhérentes telles que les PAE, la voie « R-P-A » n'est pas inductible. Par contre, une fois ces cellules rendues non adhérentes cette voie devient inductible.

Quels sont les différences induites par un changement de l'état d'adhérence qui conduisent à la possibilité d'activer ou non la voie « R-P-A » ?

Pour répondre à cette question, j'ai analysé les niveaux d'expression des protéines composant la voie « R-P-A » ou des protéines pouvant la réguler. Dans une seconde partie, j'ai analysé comment pouvait être régulée la PI3K dans le contexte de cette voie « R-P-A ».

Pour étudier les différences entre des cellules adhérentes et non adhérentes, j'ai utilisé le modèle cellulaire des A20. La lignée de cellules A20 est d'origine murine. En culture, ces lymphocytes de type B présentent la particularité de se répartir spontanément en deux populations, l'une est adhérente au plastique, l'autre reste en suspension.

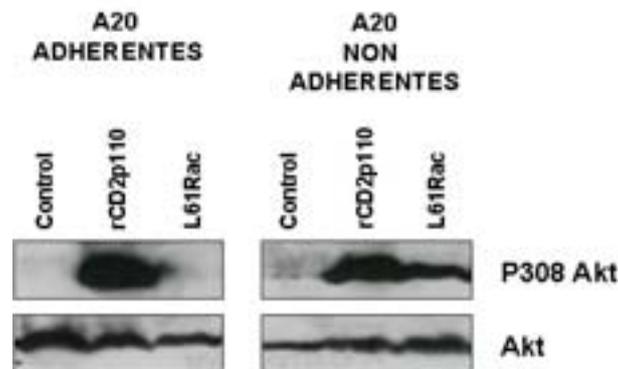
Cette particularité nous donne l'opportunité de travailler sur des cellules qui ne diffèrent que par leur état d'adhérence/suspension.

**a) Cellules A20 modèle d'étude de la voie « R-P-A ».**

Nous voulions connaître quelles étaient les différences entre un état adhérent, non permissif pour l'activation d'Akt et un état non adhérent, permissif pour l'activation d'Akt. Pour étudier cela nous avons employé les cellules A20 dont la population se répartit spontanément en deux groupes : les cellules Adhérentes et les cellules Non Adhérentes.

La première étape était donc de vérifier que dans ce modèle cellulaire la GTPase Rac constitutivement active pouvait induire l'activation de la protéine Akt.

Nous avons transfecté des cellules A20 avec la forme constitutivement active de Rac : L61Rac. La transfection de L61Rac dans les cellules Non Adhérentes permet d'induire la phosphorylation de la protéine Akt sur la Thr308 à contrario il n'y pas d'augmentation de cette phosphorylation suite à la transfection de L61Rac dans les cellules Adhérentes. Comme témoin positif nous avons utilisé une forme constitutivement active de la PI3K (rCD2p110) qui permet dans les deux groupes cellulaires l'activation de la protéine Akt (voir Figure 25).



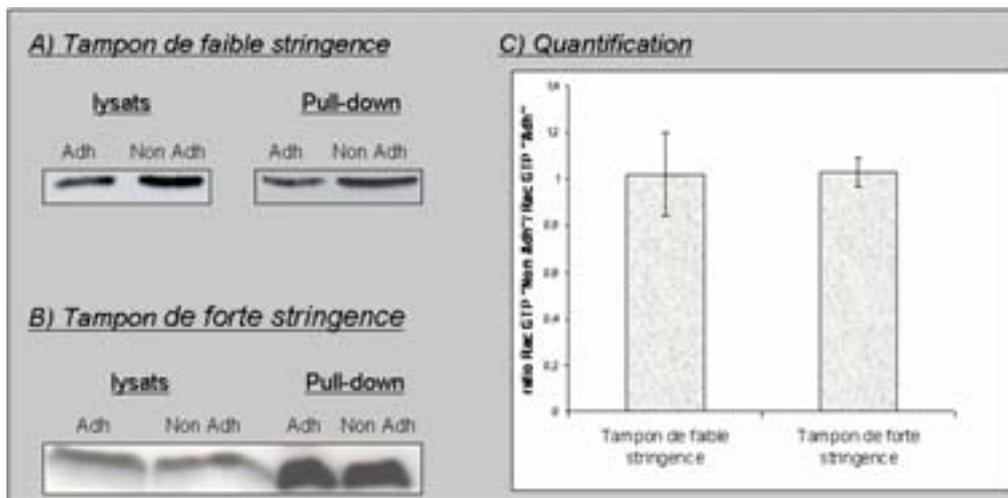
**Figure 25 L61Rac active Akt dans les cellules A20 Non Adhérentes.** Les cellules A20 ont été transfectées avec soit un plasmide vide (piste control) soit un plasmide codant pour une forme constitutivement active de la PI3K (piste rCD2P110) soit un plasmide codant pour la forme constitutivement active de Rac (piste L61Rac). Dans chacun des groupes cellulaires « Adhérentes » et « Non Adhérentes », nous avons suivi l'activation de la protéine Akt par western-blot au travers de sa phosphorylation sur le résidu Thr308.

La voie « R-P-A » est fonctionnelle dans les cellules A20 et est bien dépendante de l'état d'adhérence des cellules. Les cellules A20 vont pouvoir être utilisées pour étudier les différences entre les états Adhérents et Non Adhérents concernant la voie « R-P-A ».

**b) Analyse des niveaux d'expression des composants de la voie « R-P-A » en fonction de l'état d'adhérence dans le modèle A20.**

**(1) Niveau d'expression et Etat d'activation de Rac en fonction de l'état d'adhérence des cellules.**

Nous avons cherché à savoir si dans les cellules Non Adhérentes la proportion de Rac activée était plus forte que celle des cellules Adhérentes. Pour répondre à cette interrogation, j'ai réalisé des expériences de précipitation sélective des formes liées au GTP, avec comme appât le domaine CRIB de PAK qui se lie spécifiquement à la protéine Rac sous sa forme GTP.



**Figure 26 Niveau d'expression et état d'activation de Rac en fonction de l'état d'adhérence des cellules A20.** A) Les cellules A20 adhérentes (adh) et non adhérentes (non adh) ont été lysées dans un tampon à faible stringence, puis le lysat est incubé avec des billes GST-CRIB qui permet de précipiter sélectivement la forme active de Rac, les lysats représentent 1/10 du lysat utilisé pour la précipitation par la GST-CRIB. Les moyennes ont été établies à partir de 6 expériences indépendantes B) Idem que A, mais en utilisant un tampon de forte stringence. Les moyennes ont été établies à partir de 3 expériences indépendantes. C) Représentation du ratio : Rac activée dans les cellules non adhérentes par rapport à Rac activée dans les cellules adhérentes.

La Figure 26 compile deux types d'expériences : Dans un premier temps, j'ai comparé la proportion de Rac activée dont la distribution serait plutôt cytosolique. Dans un deuxième temps, j'ai étudié la proportion de Rac activée de l'ensemble de la cellule (fraction cytosolique et fraction normalement associée aux membranes).

Pour étudier la proportion de Rac activée dans la fraction cytosolique, j'ai utilisé un tampon « faible stringence » (composition : Tris HCl 50mM, Triton X-100 1%, NaCl 100mM, MgCl2 10mM, glycérol 5%). Pour étudier la proportion de Rac activée dans la fraction dans l'ensemble de la cellule, j'ai utilisé un tampon dit « forte stringence » contenant une forte concentration de sels et de détergents (50mM Tris HCl, Triton X-100 1%, Deoxycholate 0.5%, SDS 0.1%, NaCl 500mM, MgCl2 10mM). D'après ces expériences, je montre que la proportion de Rac activée cytosolique (Figure 26 A et C) est équivalente dans les populations

A20 Adhérentes et Non Adhérentes, de même la proportion de Rac activée est équivalente entre ces deux populations pour l'ensemble de la protéine Rac cellulaire.

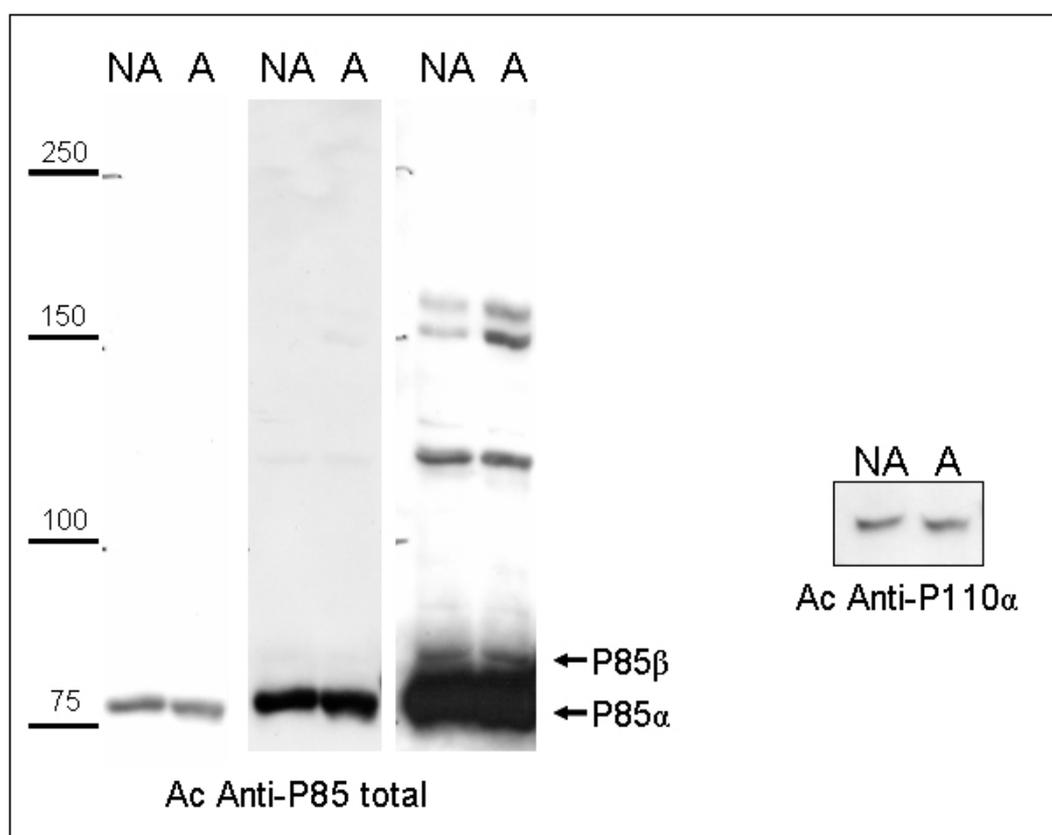
Les populations de cellules A20 Adhérentes et Non Adhérentes ne présentent pas de différence majeure dans le niveau d'activation de la protéine Rac. De plus, même si ce type d'approche n'apporte cette conclusion qu'indirectement, il semble qu'il n'y est pas de différence significative dans la distribution des formes actives de Rac aux membranes.

***(2) Expression des isoformes P85 $\alpha$  et P85 $\beta$  dans le modèle A20.***

J'ai analysé par western-blot quelle pouvait être la proportion d'isoforme P85 $\alpha$  par rapport à l'isoforme P85 $\beta$ . Pour réaliser cette expérience, j'ai utilisé l'anticorps anti-P85 (Upstate, 06-497), c'est un anticorps polyclonal qui reconnaît les deux isoformes alpha et beta. P85 $\alpha$  et P85 $\beta$  peuvent être séparées lors d'une électrophorèse réalisée dans un gel de grande taille et un pourcentage d'acrylamide de 7.5%.

D'après la Figure 27, on note que l'isoforme P85 $\alpha$  est clairement surexprimée par rapport à l'isoforme P85 $\beta$  dans les cellules A20, ce qui confirme les données de la littérature (Otsu, Hiles et al. 1991). L'identité des bandes a par la suite été confirmée par les anticorps monoclonaux dirigés contre chaque isoforme alpha et beta, soit respectivement les anticorps anti-P85 $\alpha$  U5 et anti-P85 $\beta$  T15.

Les cellules A20 sont trouvées sous deux états, adhérent et non adhérent. J'ai analysé si il y avait une différence d'expression, selon l'état d'adhérence des cellules, des isoformes P85 alpha et beta et de la sous-unité régulatrice P110 $\alpha$ . J'ai pu montrer qu'il n'y avait pas de différence significative d'expression de ces différentes protéines en fonction de l'état d'adhérence des cellules (Figure 27).

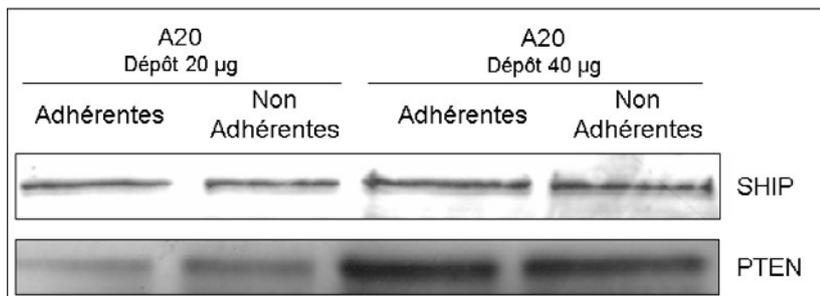


**Figure 27** Expression des sous-unités régulatrices de la PI3K, P85 $\alpha$  et P85 $\beta$ , dans les cellules A20. 50  $\mu$ g de protéines ont été déposées par puits. Cellules A20 NA : Non Adhérentes, et A : Adhérentes. Pour la détection de P85, l'anticorps anti-P85 (UBI 06-497) a été utilisé, 3 types d'expositions sont représentées. P110 $\alpha$  a été détectée par l'anticorps anti-P110 $\alpha$  (CST, 4254).

**(3) Etude des phosphatases dans les cellules A20**

Poursuivant notre étude comparative des protéines régulatrices pouvant être modulées dans la voie « R-P-A », nous nous sommes intéressé au niveau d'expression de deux protéines importantes dans la régulation de la synthèse des PhosphoInositides. Ces deux protéines PTEN (Phosphatase and TENsin homologue deleted fom chromosome-10) et SHIP (SH2-containing Inositol Phosphatase) sont deux phosphatases, elles déphosphorylent les phosphoinositides en position 3' et 5' respectivement, contrebalançant ainsi l'effet de la PI3K sur la synthèse des PIP3.

J'ai pu montrer que dans les cellules A20, il n'y a pas de différence d'expression de PTEN ni de SHIP que les cellules soient dans un état Adhérent ou Non Adhérent (voir Figure 28)



**Figure 28** Analyse de l'expression des phosphatases PTEN et SHIP dans les cellules A20 : Adérentes ou Non Adhérentes. 20 ou 40 µg de protéines ont été déposées par puits. Les anticorps utilisés sont : SHIP UBI #06-832, dilué au 1/250ème et PTEN Santa Cruz clone A2B1, dilué au 1/1000ème.

La spécificité d'activation de la voie « R-P-A » pour un certain état d'adhérence, ne dépend pas de l'expression de ces deux phosphatases. Nous avons mis en évidence dans les DT40 que l'absence de SHIP était suffisante pour permettre l'activation de la voie « R-P-A » dans les cellules adhérentes. La régulation par SHIP et peut-être par PTEN ne dépendrait donc pas du niveau d'expression de ces protéines mais pourrait dépendre de leur localisation cellulaire. En effet, il pourrait exister des différences de localisation de ces protéines régulées par l'adhérence.

**c) Régulation de la PI3K au sein de la voie « R-P-A »**

Nous avons pu montrer que l'activité PI3K est indispensable à l'activation d'Akt induite par Rac (Genot, Arrieumerlou et al. 2000). En effet, l'ajout d'inhibiteurs de la PI3K bloque complètement l'activation d'Akt. Dans cette voie, nous montrons que Rac est en amont de la PI3K et nous avons cherché à comprendre comment la GTPase Rac pouvait influencer sur la PI3K régulatrice d'Akt.

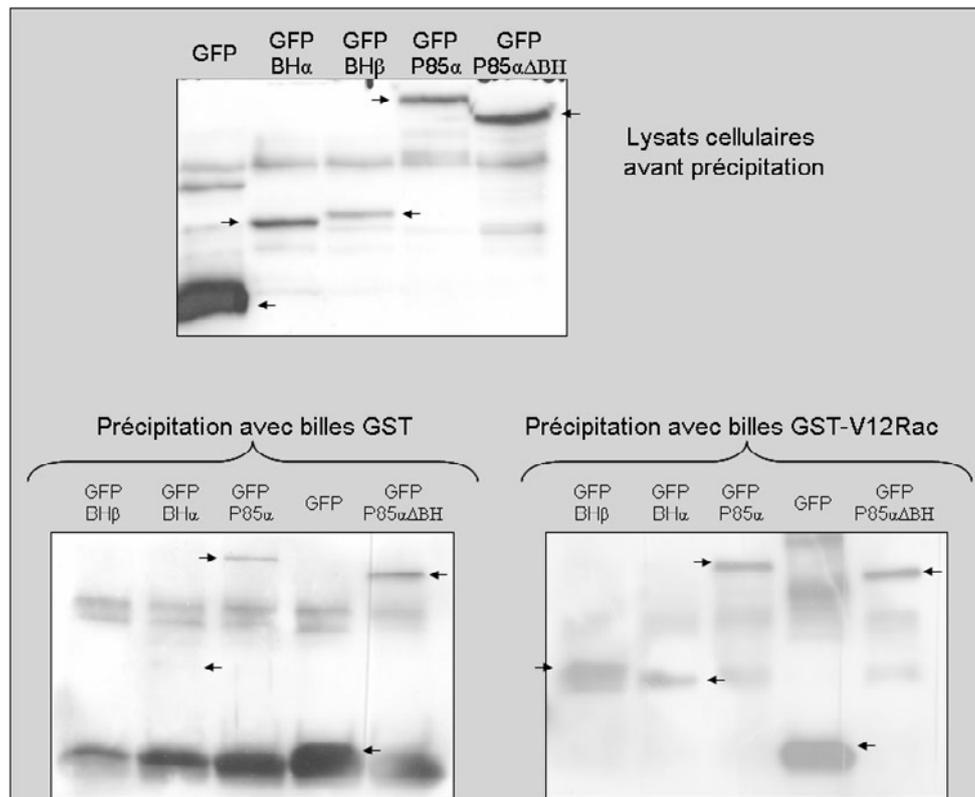
**(1) Rac activateur de la PI3K ?**

J'ai décrit dans l'introduction le domaine BH présent dans les deux isoformes P85 $\alpha$  et P85 $\beta$ , ce domaine a la capacité d'interagir avec Rac et Cdc42 et nous pensons que Rac viendrait activer la PI3K par le biais d'une interaction avec la sous-unité P85.

**(a) Etude de l'interaction P85-Rac**

**Précipitation par GST Pull-Down**

Afin d'étudier l'interaction entre la sous-unité P85 et Rac, j'ai réalisé une série d'expériences de précipitation sélective. Dans ces expériences, l'appât utilisé est soit la protéine GST-V12Rac soit la protéine GST seule. Les constructions GFP-BH $\alpha$ , GFP-BH $\beta$ , GFP-P85 $\alpha$ , GFP-P85 $\alpha\Delta$ BH, sont surexprimées dans les cellules A20, puis les lysats sont mis en contact avec soit des billes GST, soit avec des billes GST-V12Rac (voir Figure 29).



**Figure 29 Précipitation de la sous-unité P85 et ses mutants par GST pull-down.** Des cellules A20 ont été transfectées par différentes constructions (30 $\mu$ g d'ADN) codant pour la GFP, GFP-BH, GFP-BH $\alpha$ , GFP-BH $\beta$ , GFP-P85 $\alpha$  et GFP-P85 $\alpha$  $\Delta$ BH. Les lysats des cellules transfectées ont été utilisés pour réaliser les précipitations sélectives avec des billes-GST ou des billes-V12Rac. Détection par Western-Blot avec l'anticorps anti-GFP.

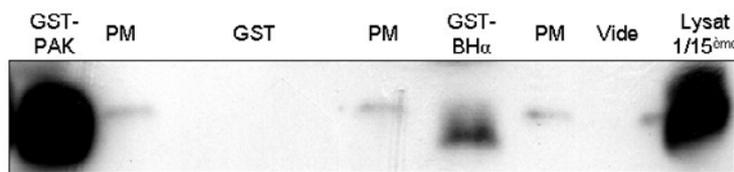
Je n'ai pas pu tenir compte du résultat de ces expériences, car on peut noter que l'ensemble des constructions y compris la GFP seule vont s'associer avec les billes GST-V12Rac ainsi qu'avec les billes GST-seule ; en effet, il semble que la GFP ait de l'affinité soit pour les billes Glutathionne-Agarose soit pour la GST. Pour conclure, ceci m'a amené à revoir ma stratégie et c'est ainsi que j'ai décidé de changer d'étiquette pour chacune des constructions, en étiquetant les constructions avec l'Hémagglutinine.

**(b) Le domaine BH, domaine responsable de l'interaction P85-Rac.**

Pour étudier l'interaction entre Rac et la sous-unité P85, j'ai utilisé les domaines BH fusionnés à l'étiquette GST. A partir d'un lysat cellulaire, j'ai regardé si la protéine Rac endogène pouvait venir se lier au domaine BH $\alpha$  ou BH $\beta$ .

**(i) Rac et l'isoforme  $\alpha$  de P85**

Etude de l'interaction par précipitation sélective par l'utilisation de la protéine GST-BH $\alpha$ .

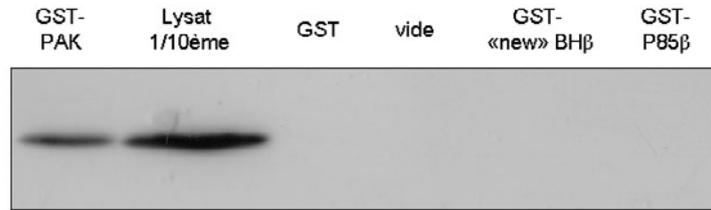


**Figure 30 Le domaine BH de P85 $\alpha$  interagit avec Rac.** Un lysat de cellules A20 est incubé pendant 1 heure en présence de billes GST, GST-PAK et GST-BH $\alpha$ . Western-Blot révélé avec l'anticorps anti-Rac.

Cette expérience montre clairement que le domaine BH de la protéine P85 $\alpha$  s'associe avec la protéine Rac. Cette interaction est néanmoins faible si on compare l'interaction de Rac avec le domaine CRIB de son effecteur PAK.

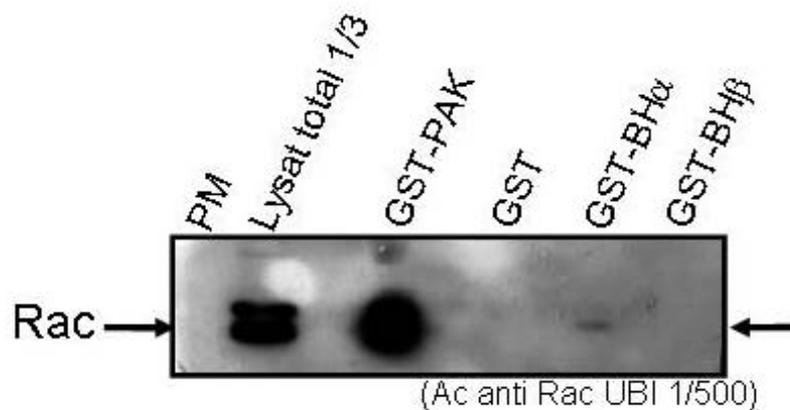
(ii) Rac et l'isoforme  $\beta$  de P85

Etude de l'interaction par précipitation sélective par l'utilisation de la protéine GST-BH $\beta$ .



**Figure 31** Le domaine BH de P85 $\beta$  n'interagit pas avec Rac. Un lysat de cellules A20 est incubé pendant 1 heure en présence de billes GST, GST-PAK et GST-BH $\beta$ . Western-Blot révélé avec l'anticorps anti-Rac.

En ce qui concerne l'étude de l'interaction de Rac avec le domaine BH de P85 $\beta$ , je n'ai pas détecté d'interaction. De plus, même avec la protéine P85 $\beta$  entière, je ne détecte pas d'interaction.



**Figure 32** Analyse comparative de l'association de Rac avec le domaine BH de P85 $\alpha$  et le domaine BH de P85 $\beta$ . Un lysat de cellules A20 est incubé pendant 1 heure en présence de billes GST, GST-PAK, GST-BH $\alpha$  et GST-BH $\beta$ . Western-Blot révélé avec l'anticorps anti-Rac.

Concernant l'interaction de Rac avec les sous-unités régulatrices P85 $\alpha$  et P85 $\beta$ , il apparaît qu'il y a une spécificité de liaison, Rac ne pouvant interagir qu'avec P85 $\alpha$  (voir Figure 32). Dans le contexte de la voie « R-P-A », si Rac régule la PI3K via une interaction avec le domaine BH des sous-unités régulatrices, cette interaction se fera alors par le biais de P85 $\alpha$ .

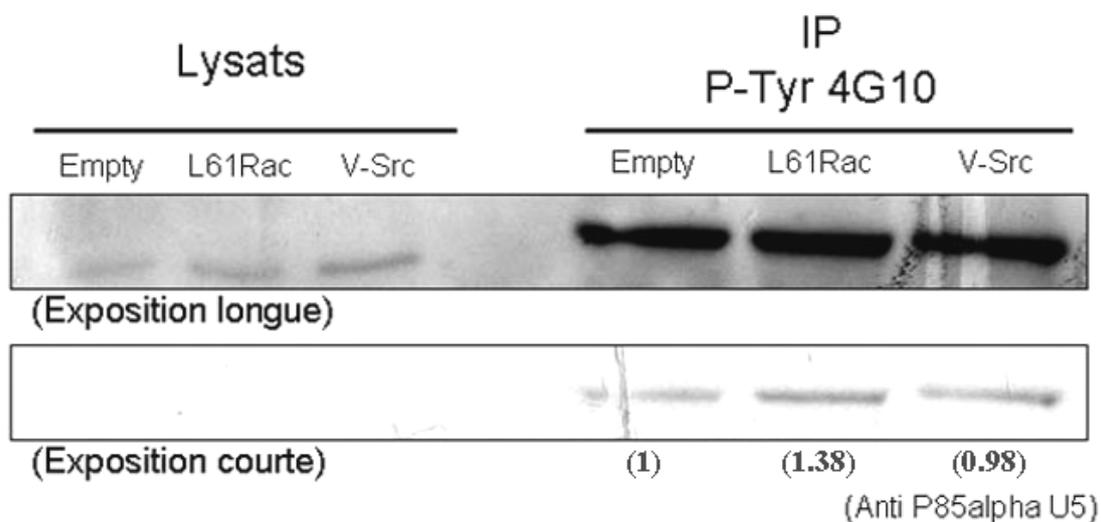
**(c) Rac régule-t-il la phosphorylation de P85 $\alpha$  ?**

L'activité de la PI3K peut être régulée par une modification de l'état de phosphorylation de la sous-unité régulatrice P85 (voir introduction). Ces phosphorylations sont supposées induire une modification conformationnelle de P85 permettant de lever l'inhibition qu'elle exerce sur la PI3K ou alors pourrait permettre un recrutement de plusieurs PI3K (Cuevas, Lu et al. 2001).

Dans le contexte de la voie « R-P-A », j'ai posé l'hypothèse que Rac pourrait induire un changement de l'état de phosphorylation de la sous-unité P85 $\alpha$  permettant une activation de la PI3K et donc d'Akt.

Pour tester cette hypothèse, j'ai transfecté des cellules Jurkat et j'ai ensuite immuno-précipité les protéines phosphorylées sur les résidus Tyrosine à l'aide d'un anticorps dirigé contre les protéines tyrosine phosphorylées.

Les résultats de cette expérience (voir Figure 33) semblent montrer que la forme active de Rac (L61Rac) entraîne une augmentation de la phosphorylation de la protéine P85 $\alpha$  comparé à la piste où L61Rac n'est pas transfecté (transfection d'un vecteur vide). La transfection de la protéine V-Src n'induit pas de modifications de la phosphorylation de P85 $\alpha$ .



**Figure 33 Rac induit la phosphorylation de P85 $\alpha$ .** Les lysats des cellules Jurkat non transfectées (empty) transfectées par L61Rac (L61Rac) ou transfectées par v-Src (v-Src) ont été incubés en présence de l'anticorps anti-P-Tyr (4G10) pendant 1 heure. Les protéines immunoprécipitées ont été révélées par l'anticorps anti-P85 $\alpha$  U5. Les pistes Lysats représentent 1/10<sup>ème</sup> du lysat utilisé pour l'immunoprécipitation.

C'est une première expérience qu'il sera nécessaire de confirmer. Il sera intéressant de comprendre les mécanismes qui conduisent à une phosphorylation de P85 $\alpha$  dépendante de Rac. Dans un second temps, il faudrait connaître les sites de phosphorylations afin de réaliser des mutants sur ces sites pour savoir s'ils sont suffisants pour induire l'activation de la PI3K ou bien une autre activité de signalisation.

**d) Conclusions sur l'étude de la régulation de la voie « R-P-A ».**

Differences entre l'état Adhérent et l'état Non Adhérent :

Dans ce chapitre j'ai résumé les travaux accomplis dans le but d'étudier les différences entre un état adhérent non permissif pour l'activation de la voie « R-P-A » et un état non adhérent permissif. Pour étudier cela j'ai utilisé le modèle A20 où j'ai pu montrer que la voie « R-P-A » était activable et qu'elle était bien sous dépendance de l'état d'adhérence des cellules. J'ai étudié le niveau d'expression de protéines composants la voie ou pouvant être des régulateurs. J'ai pu montrer qu'il n'y avait pas de régulation de l'expression de la protéine Rac ni de son activation en fonction de l'état d'adhérence, de même, l'expression des régulateurs négatifs de la PI3K, PTEN et SHIP, ne varie pas. Enfin, les composants de la PI3K, P110 $\alpha$ , P85 $\alpha$  et P85 $\beta$  ne voient pas leur expression varier entre cellules adhérentes et non adhérentes. La régulation de la voie « R-P-A » pourrait se faire alors par une localisation différentielle de chacune de ces molécules en fonction de l'état d'adhérence. Les travaux sur la protéine SHIP dans les DT40 montrent que la localisation de cette protéine est modifiée par l'adhérence cellulaire.

Rac activateur de la PI3K ?

- Rac phosphorylé P85 :

Rac pourrait agir sur P85 en induisant la phosphorylation de P85 ; les premiers essais tendent à montrer que ce peut-être le cas mais cela reste à vérifier ; puis il faut connaître les effets de cette phosphorylation : Ces phosphorylations peuvent elles induire une activation de la PI3K?

Dans le cadre de la voie « Rac-PI3K-Akt », un scénario possible est le suivant : Rac actif interagirait avec la sous-unité P85 $\alpha$ , Rac modulerait la phosphorylation ou la dimérisation de P85 $\alpha$ , cette interaction permettrait de lever l'inhibition qu'exerce P85 sur P110 rendant ainsi la PI3K pleinement active. La synthèse de PIP3 permettrait alors l'activation de la protéine Akt.

Cette hypothèse est appuyée par les données de la littérature qui montrent que Rac permet d'activer la PI3K (Inabe, Ishiai et al. 2002). Dans un premier temps pour montrer que Rac active la PI3K, nous pourrions comparer la synthèse de PIP3 dans des cellules non transfectées et des cellules transfectées par V12Rac. Les PIP3 étant mesurés par

l'intermédiaire d'anticorps reconnaissant ces molécules. Dans un second temps, pour montrer que le domaine BH est nécessaire à cette régulation, nous pourrions utiliser une approche d'ARN interférents. Il s'agirait d'éteindre l'expression de la protéine P85 $\alpha$  (et si nécessaire P85 $\beta$ ) et de transférer soit la protéine exogène P85 $\alpha$  pour restaurer la voie, soit transférer la protéine exogène P85 $\Delta$ BH, dans ce dernier cas la voie « R-P-A » ne devrait plus être fonctionnelle par la perte de l'interaction de Rac avec P85. Une autre approche envisageable serait la surexpression des domaines BH isolés qui viendraient alors agir comme des inhibiteurs soit en fixant Rac soit en empêchant la liaison de Rac-P85 par la fixation du BH sur la protéine P85 endogène. Enfin, nous pourrions utiliser un mutant de Rac devenu incapable de se lier au domaine BH de P85, mais toujours capable d'interagir avec ses effecteurs.

Quels isoformes de P85 est nécessaire à la voie « R-P-A » ?

J'ai pu montrer que seul le domaine BH de P85 $\alpha$  peut interagir avec Rac. Si Rac active la PI3K, je pense que cette activation dépend d'une interaction spécifiquement avec P85 $\alpha$  et non avec P85 $\beta$ . Afin de vérifier s'il y a une spécificité des isoformes P85 dans la voie « R-P-A », j'envisage d'utiliser l'approche d'ARN interférents ; nous pourrions vérifier l'activation de la voie en l'absence de l'une ou l'autre des deux isoformes : P85 $\alpha$  et P85 $\beta$ .



**e) Conclusions générales sur la voie « R-P-A »**

Les cellules naturellement adhérentes entrent rapidement en apoptose lorsqu'elles sont privées d'interaction cellule-cellule ou cellule matrice via le mécanisme d'anoïkis. L'expression d'une forme constitutivement active de Rac (V12Rac ou L61Rac) peut bloquer ce processus apoptotique. Aussi, Akt et la PI3K sont des protéines qui régulent les mécanismes de l'anoïkis ; dans une cellule normalement adhérente, les structures d'adhérence via les intégrines permettent l'activation de la protéine Akt permettant ainsi une protection vis-à-vis de l'apoptose. Une cellule dont l'état d'adhérence serait perturbé va enclencher l'anoïkis par perte du signal protecteur induit par Akt.

Nous avons montré que la voie « R-P-A » est spécifiquement activée dans les cellules en suspension. Donc il existe une voie d'activation d'Akt indépendante des structures d'adhérence. Nous postulons que cette voie serait un mécanisme de protection contre l'anoïkis dans le cas des cellules adhérentes. Lors de processus cellulaire tels que la migration ou la division cellulaire, la cellule perd momentanément une partie de ses structures d'adhérence. Afin d'éviter que cette cellule, non « défectueuse », entre en apoptose la voie « R-P-A » pourrait être mise en place afin d'apporter des signaux de survie.

Suite à ces travaux, d'autres équipes ont pu montrer que effectivement Rac (ou même Cdc42) induisait l'activation d'Akt, cette activation étant nécessaire à la protection contre l'anoïkis (Coniglio, Jou et al. 2001; Zugasti, Rul et al. 2001). Récemment, une équipe a montré que l'activation de Rac et Cdc42 par la GEF : Dbl permettait l'activation d'Akt suivie d'une protection contre l'apoptose (Morley, Wagner et al. 2006). De plus, ils montrent qu'il existe une interaction entre Cdc42 et PDK1, cette interaction pourrait être l'élément permettant l'activation d'Akt. Dans le contexte de la voie « R-P-A », il serait intéressant de vérifier s'il n'existe pas également une telle interaction entre Rac et PDK1.



### **3. Troisième Partie : « Formation des podosomes sous le contrôle de la GTPase Cdc42 dans des cellules endothéliales. »**

#### **a) Introduction du papier**

Le modèle d'étude présenté ici est les PAEV12CDC42 (Davis, Stephens et al. 1999), ce sont des Cellules Aortique de Porc transfectées de façon stable avec un plasmide permettant l'expression du transgène V12CDC42, l'expression est induite par ajout d'IPTG (0.1 mM) dans le milieu de culture. La surexpression de la forme active V12Cdc42 conduit à la réorganisation du cytosquelette d'actine, avec la disparition des fibres de stress et des contacts focaux et l'apparition des podosomes. La détection des podosomes se fait dès 4 heures d'induction.

Les podosomes sont des structures ponctiformes avec un cœur composé d'actine-F et un anneau riche en protéines dont la vinculine ; ces structures sont retrouvées au niveau de la surface ventrale des cellules. Pour observer les podosomes nous réalisons un co-marquage de l'actine-F par la rhodamine-phalloïdine et de la vinculine par immunomarquage.

L'article (Moreau, Tatin et al. 2006) présente les podosomes dans les cellules endothéliales (Voir chapitre Annexes).

b) « Cdc42-driven podosome formation in endothelial cells »



Available online at [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)



European Journal of Cell Biology 85 (2006) 319–325

European Journal  
of Cell Biology

[www.elsevier.de/ejcb](http://www.elsevier.de/ejcb)

## Cdc42-driven podosome formation in endothelial cells

Violaine Moreau, Florence Tatin, Christine Varon, Gueric Anies,  
Catherine Savona-Baron, Elisabeth Génot\*

*Institut Européen de Chimie-Biologie, Université Bordeaux 1, Pessac, and INSERM Unité 441,  
Université Bordeaux Victor Segalen Bordeaux 2, Bordeaux, France*

### Abstract

Ectopic expression of a constitutive active mutant of the GTPase Cdc42 (V12Cdc42) in vascular endothelial cells triggers the dissolution of stress fibres and focal adhesion contacts and causes the repolymerisation of actin into dots. Each punctate structure consists of an F-actin core surrounded by a vinculin ring, consistent with the definition of podosomes. We now report further analysis of these complexes and show the presence of established podosomal markers such as cortactin, gelsolin, dynamin, N-WASP, and Arp2/3 which are absent in focal adhesions. Endothelial podosomes appear as randomly distributed conical structures, distributed on, but restricted to, the ventral membrane and confined to contact sites between cells and their substratum. The nature of the extracellular matrix does not influence podosome formation nor their spatial organisation. Induction of podosomes in response to V12Cdc42 is not associated with a migratory nor with a proliferative phenotype. These results add endothelial cells to the list of cell types endowed with the ability to form podosomes *in vitro* and raise the possibility that endothelial cells could form such structures under certain physiological or pathological conditions.

© 2005 Elsevier GmbH. All rights reserved.

**Keywords:** Podosomes; Endothelial cells; Cdc42; GTPases; F-actin

### Introduction

Cytoskeletal rearrangements are central to endothelial cell physiology and are controlled by soluble factors, matrix proteins, cell-cell interactions and mechanical forces. Within the endothelium lining the inner surface of blood vessels, endothelial cells are subjected to haemodynamic forces caused by blood flow and dilate or contract in response to vasoactive substances. Cytoskeletal plasticity is also required for correct extravasation of blood-borne leucocytes at sites of inflammation. Cytoskeleton organisation is affected

when cell-cell interactions are disrupted at the initiation of the angiogenic program, when cells detach from the endothelium and then proliferate and migrate to extend the preexisting vascular network. Such abundance and diversity of signals impact on cytoskeletal organisation and produce a wide range of actin configurations, which therefore represent a critical aspect of endothelial cell physiology. Podosomes form spontaneously in certain cell types of haematopoietic origin, such as monocytes/macrophages and osteoclasts (Linder and Aepfelbacher, 2003). The hemangioblast being a common progenitor to blood and endothelial cells (Choi et al., 1998), we investigated whether endothelial cells share the ability to form podosomes with these cells of haematopoietic origin. We report that a constitutively active mutant of Cdc42 but not its wild-type or dominant negative forms

\*Corresponding author. Tel.: +33 5 4000 3056;  
fax: +33 5 4000 8726.

E-mail address: [e.genot@iecb.u-bordeaux.fr](mailto:e.genot@iecb.u-bordeaux.fr) (E. Génot).

induces the formation of podosomes. We describe V12Cdc42-induced podosomes and certain aspects of cell behaviour observed in these podosome-bearing cells.

## Materials and methods

### Reagents and antibodies

Puromycin, hygromycin B, isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside (IPTG) and Mowiol 4 88 were from Calbiochem. Collagen type I and fibronectin were from BD Biosciences. Antibodies against vinculin (hVIN-1) were from Sigma. Anti-myc (9E10), anti-phosphotyrosine (4G10) and anti-p85 $\alpha$  (U5) antibodies were kind gifts from Dr. D. Cantrell (University of Dundee, Dundee, UK). Antibodies against gelsolin were kindly supplied by Dr. C. Chaponnier (University of Geneva, Geneva, Switzerland). Polyclonal anti-Arp3 antibodies were from Dr. M. Welch (University of California, Berkeley, USA), anti-dynamin 2 antibodies from Dr. M. McNiven (Rochester, USA), and anti-N-WASP antibodies from Dr. M. Way (London Research Institute, London, UK). Further antibodies were against cortactin (clone 4F11) (Upstate Biotechnology International), Cdc42, beta3 integrin, p190RhoGAP, VASP (Cell Signalling Technologies). WIP-myc tag construct was from D. Stewart (Bethesda, USA). Rhodamine-phalloidin and FITC-labeled secondary antibodies were purchased from Molecular Probes. Propidium iodide was from Sigma.

### Cell culture

Porcine aortic endothelial (PAE) cells obtained from Dr. Saklatvala (Kennedy Institute of Rheumatology, London, UK) were maintained in F12 medium (Ham F12; GIBCO BRL) supplemented with 10% heat-inactivated FCS (GlobePharm) and antibiotics. Cells were maintained at 37 °C in a humidified atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> and 95% air. PAE cell lines expressing either V12, N17 or WTCdc42 under the control of an IPTG-inducible promoter were established previously (Davis et al., 1999) and cultured in the same medium supplemented with 100  $\mu$ M hygromycin B and 500 nM puromycin. Expression was achieved by adding 0.1 mM IPTG to the cultures.

### Immunofluorescence microscopy

Cells plated onto glass coverslips were prepared for immunofluorescence microscopy as previously described (Moreau et al., 2003). The coverslips were washed in water and mounted on microscope slides using Mowiol 4 88 mounting medium. Images were acquired using a

TE2000 Nikon inverted fluorescence microscope and a Nikon DXM 1200 camera (LUCIA 5.0 acquisition software, Nikon). Confocal images were captured on an Eclipse E800 Nikon microscope. The images were processed using Adobe Photoshop 5.5 (Adobe Systems). The number of cells showing podosomes was assessed in three independent experiments in which at least 200 cells were counted.

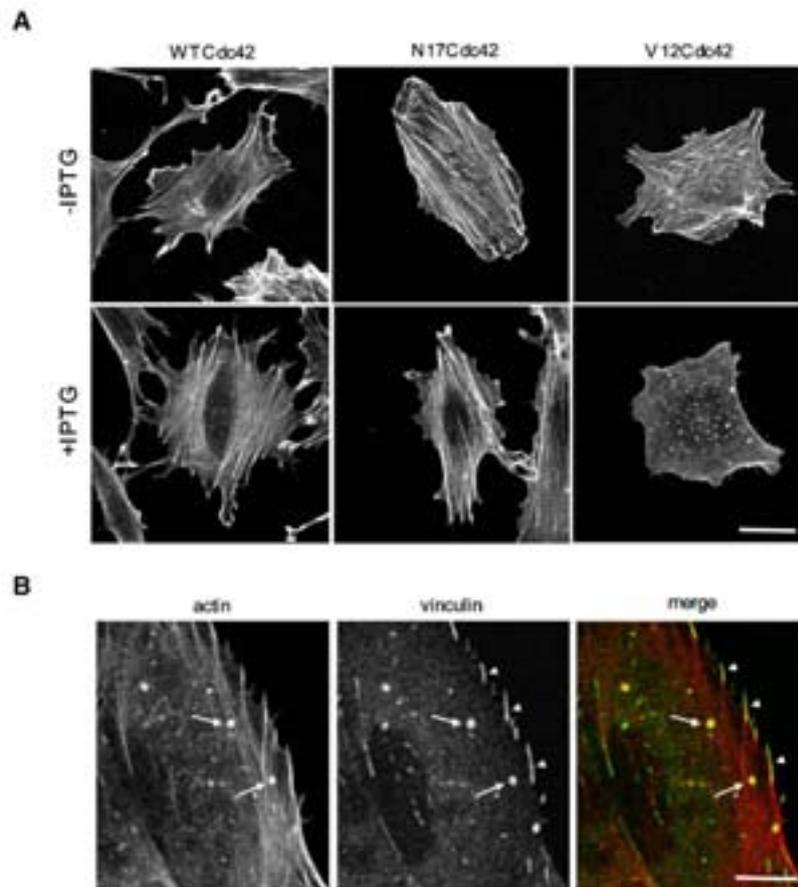
### Wound healing assay

Endothelial cells were seeded in six-well tissue culture plates and grown to confluence. The cell monolayer was wounded with a sterile plastic pipette tip to generate a wound with a width of approximately 1 mm. The cell monolayer was washed with PBS to remove cell debris and incubated in complete medium at 37 °C. Images were taken using a phase-contrast microscope with a 5 $\times$  lens, directly after wounding and after a 10-h incubation period. Cell migration was determined by counting the number of cells within the wound area. Experiments were done in triplicate and four fields from each well were randomly selected for cell counting. The percentage of migrating cells was determined and is presented as percentage of the control response.

## Results and discussion

Cytoskeletal arrangements, including podosomes, are controlled by members of the Rho family of GTPases. By analysing the effects of ectopic expression of constitutively active mutants of this class of proteins on F-actin organisation, we discovered that endothelial cells can form podosomes. Using inducible PAE cell lines (Davis et al., 1999) we show that only over-expression of active (V12Cdc42), but not wild-type (WTCdc42) nor dominant negative (N17Cdc42) Cdc42, triggered podosome formation (Fig. 1A). In this model, podosomes appeared scattered all over the ventral cell surface (Fig. 1A). At higher magnification the characteristic podosomal protein organisation consisting in a core of F-actin surrounded by a ring of vinculin could be seen (Fig. 1B). Interestingly, filopodia-like protrusions could also be observed at the periphery of V12Cdc42-expressing PAE cells and elongated focal complexes had replaced the classical focal adhesions (Fig. 1B).

In a time-course experiment analysing actin polymerisation upon V12Cdc42 transgene expression, we observed the first podosomes as early as 4 h after induction, when V12Cdc42 protein became detectable by Western blot (data not shown). At 24 h, about 25% of the cells had flattened, lost their stress fibres and presented isolated or scattered podosomes. By 48 h, about half of the cells had increased in volume and



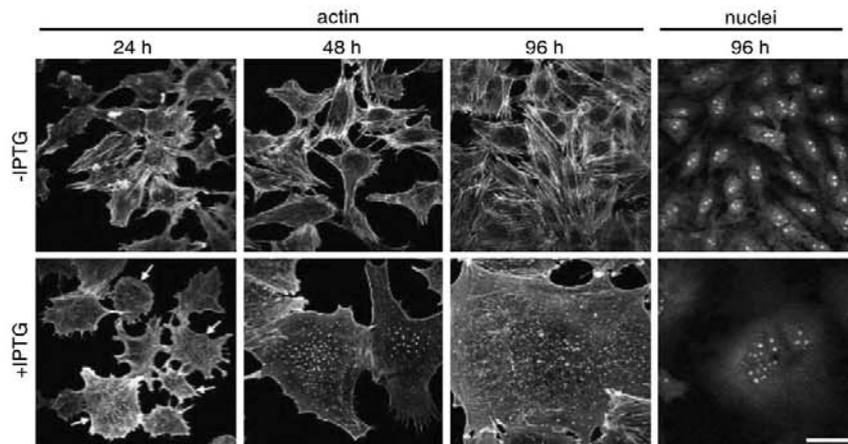
**Fig. 1.** Overexpression of V12Cdc42 leads to podosome formation. (A) Established PAE cell lines, in which expression of WTCdc42, N17Cdc42 or V12Cdc42 has been put under the control of an IPTG-inducible promoter, were induced with IPTG, or left untreated. Cells were fixed after 24 h; F-actin was labelled with rhodamine-phalloidin. Bar, 50  $\mu$ m. (B) Higher magnification of podosomes (arrows) and elongated focal complexes (arrowheads) in IPTG-induced V12Cdc42-expressing cells stained for F-actin (red) and vinculin (green). Bar, 25  $\mu$ m.

presented podosome structures. After 96 h, the culture consisted in a confluent monolayer of giant multi-nucleated cells, where most of them had reorganised their actin into podosomes (Fig. 2). Characteristic components of podosomes were found in these V12Cdc42-induced actin structures. By immunofluorescence, we colocalised several podosomal markers such as cortactin, dynamin, N-WASP and Arp2/3, together with other structural and functional proteins known to be present at podosomes in other models (Linder and Aepfelbacher, 2003). Table 1 lists the podosomal components found at V12Cdc42-induced podosomes in PAE cells. Consistent with the definition of podosomes, the V12Cdc42-induced actin structures were exclusively found at the ventral surface of the endothelial cell, in close contact with the substratum (data not shown).

According to their putative role in cell adhesion, we analysed the influence of the extracellular matrix on

podosome formation and organisation. PAE cells were seeded on either fibronectin or collagen-coated coverslips, podosome formation was triggered by inducing V12Cdc42 expression, and actin-phalloidin staining was performed to visualise podosomes. None of the two tested matrix proteins had detectable effects on either podosome formation or on their spatial organisation (Fig. 3). Likewise, serum components did not affect these parameters (data not shown).

Podosome formation has also been associated with a migratory behaviour. In fact, the migratory phenotype seems to correlate with podosome spatial distribution at the ventral surface. For instance, podosomes form a belt at the cell periphery of osteoclasts seeded on glass coverslips and this phenotype is associated with a non-motile behaviour. In contrast, podosomes clusters are found at the leading edge of these cells as they migrate (Sanjay et al., 2001). We therefore analysed the



**Fig. 2.** V12Cdc42 induces podosome formation and multinucleation. V12Cdc42 expression was triggered with IPTG, or not, in cells of the inducible V12Cdc42 PAE cell line. Cells were fixed after 24, 48, 96 h. F-actin and nuclei were labelled with rhodamine-phalloidin and propidium iodide, respectively. Cells showing podosomes at 24h are shown (arrows). Bar, 100  $\mu$ m.

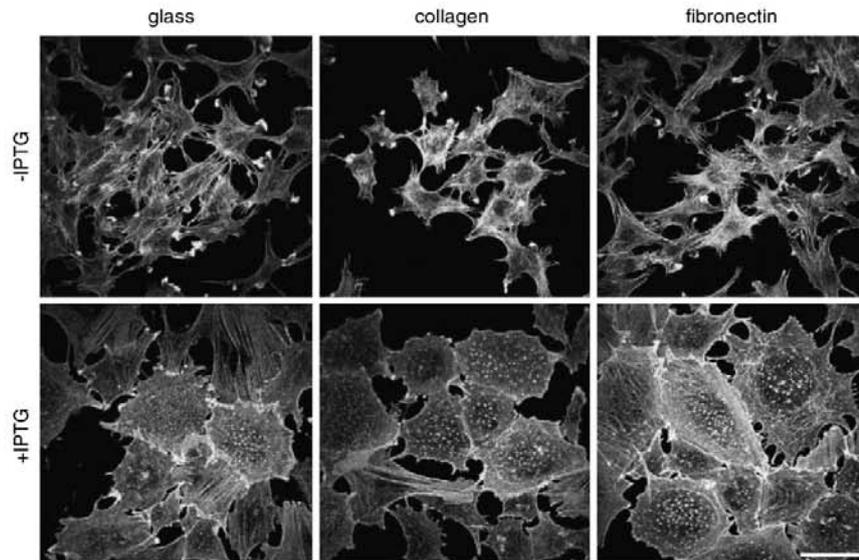
**Table 1.** Podosomal markers found at V12Cdc42-induced podosomes in PAE cells

Component	Localised at focal adhesions	First demonstration at podosomes Cell type (reference)
Vinculin	Yes	Fibroblasts (Tarone et al., 1985)
VASP	Yes	Endothelial cells (Dutartre et al., 1996)
pTyr	Yes	Fibroblasts (Tarone et al., 1985)
Integrin $\beta$ 3	Yes	Osteoclasts (Pfaff and Jurdic, 2001)
Cdc42	No	Macrophages (Linder et al., 1999)
Gelsolin	No	Osteoclasts, macrophages, fibroblasts (Marchisio et al., 1987)
Cortactin	No	Breast carcinoma cells (Schuuring et al., 1993)
Dynamin	No	Osteoclasts (Ochoa et al., 2000)
p85 $\alpha$ (PI3 K)	No	Osteoclasts (Lakkakorpi et al., 1997)
N-WASP	No	Fibroblasts (Mizutani et al., 2002)
WIP	No	Endothelial cells (Moreau et al., 2003)
Arp2/3	No	Macrophages (Linder et al., 2000)
p190RhoGAP	No	Smooth muscle cells (Burgstaller and Gimona, 2004)

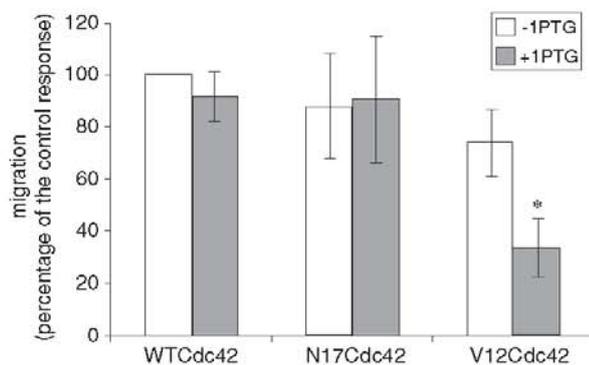
migration pattern of V12Cdc42-expressing cells which presented an alternative podosome arrangement. A wound healing assay comparing V12Cdc42 cells with wild-type or dominant negative Cdc42-expressing cells revealed that, in this model, cells harbouring podosomes are far less motile than uninduced control cells without podosomes (Fig. 4). Yet, it remains unclear whether the presence or spatial distribution of podosomes or other Cdc42-dependent effects inhibit the motility of these cells.

V12Cdc42-expressing PAE cells demonstrated a reduced proliferation rate (Fig. 5). The number of cells expressing V12Cdc42 remained constant over a 96 h time period whereas the control cell population doubled every 20 h. Such phenomenon was not seen in uninduced

or induced N17Cdc42 or WTCdc42 PAE cells (Fig. 5). Concomitantly, the V12Cdc42-expressing cells became giant and multinucleated (Fig. 2). Intriguingly, giant multinucleated cells seem to be somehow connected with podosome formation. Indeed, podosomes have been described in osteoclasts, foreign body giant cells (DeFife et al., 1999) and differentiated trophoblast giant cells (Parast et al., 2001), which all display a giant multinucleated phenotype at least at one point in their differentiation. In these cells, multinucleation results from a cell fusion process. Multinucleation observed here in PAE cells resulted from impaired mitosis as previously reported (Muris et al., 2002). The formation of multinucleated giant cells has already been described in response to increased Cdc42 activity resulting from



**Fig. 3.** The extracellular matrix has no influence on podosome formation or spatial distribution. V12Cdc42 PAE cells were seeded on glass coverslips uncoated or coated with either collagen or fibronectin, and then induced or not with IPTG for 24 h. F-actin was labelled with rhodamine-phalloidin. Bar, 100  $\mu$ m.



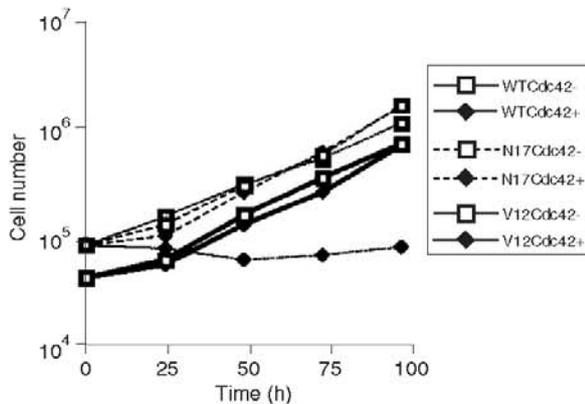
**Fig. 4.** V12Cdc42 inhibits PAE cell migration. Established PAE cell lines inducible for the expression of WTCdc42, N17Cdc42 or V12Cdc42 were seeded on a plate and were induced to express the transgene with IPTG for 24 h or left untreated. Migration was analysed by counting the cells which have migrated into a wound over a 10-h period; and data are presented as control of WTCdc42 response taken as 100%. Values are means  $\pm$  SEM from three separate experiments (\* $p < 0.01$ ).

either constitutively active Cdc42, Cdc42-GEF or defective Cdc42-GAP mutants (Dutartre et al., 1996; Imai et al., 2002; Osman and Cerione, 1998). Whether podosome appearance in V12Cdc42-expressing PAE cells is coupled to multinucleation remains to be determined.

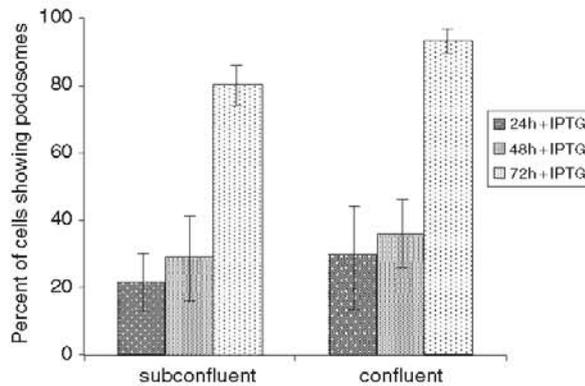
Podosomes have been described in cell types that do not form cellular junctions. Endothelial cells differ from

these as they establish several types of junctional contacts to form a continuous endothelium. We therefore examined the impact of cell confluency on podosome formation in our model. Cells were seeded as sparse cultures at two different densities and were induced to form podosomes. Subsequently, the number of cells with podosomes was assessed at different time points. We found that, in this model, confluency did not affect the number of cells with podosomes but in both cases, many more cells with podosomes were seen in 72-h cultures compared with the earlier time points (Fig. 6).

The model described herein, in which overexpression of an active form of Cdc42 amplifies and stabilises Cdc42-regulated processes in endothelial cells, has allowed us to discover that endothelial cells can be added to the extending list of cell types endowed with the ability to form podosomes. These podosomes share many features with podosomes described in other models but cell behaviour associated with V12Cdc42 expression is markedly distinct from that of other podosome-bearing cells. Numerous physiological stimuli such as cytokines (Gadea et al., 2004), extracellular matrix proteins (Weston et al., 2000) or shear stress (Li et al., 1999), all encountered in the complex environment of blood vessels, are well characterised regulators of Cdc42 activity. These data raise the possibility that endothelial cells are susceptible to form podosomes under certain physiological or pathological conditions; and unravelling the functions of podosomes in endothelial cells appears as a novel challenge. Podosomes, which have also been described in vascular smooth muscle cells



**Fig. 5.** V12Cdc42 inhibits proliferation. Established PAE cell lines inducible for the expression of WTCdc42, N17Cdc42 or V12Cdc42 were seeded on 6-well plates (100,000 cells per well) and induced to express the transgene with IPTG or left untreated. IPTG-stimulated and control cells were detached from the wells and counted at 24, 48, 72 and 96 h after induction.



**Fig. 6.** Cell confluency does not influence podosome formation. V12Cdc42 PAE cells were seeded at low (~1000 cells/cm<sup>2</sup>, subconfluent) and high (~4000 cells/cm<sup>2</sup>, confluent) densities on glass coverslips, then induced with IPTG. Cells were fixed and analysed for podosome formation at different time points. Four hundred cells were counted per coverslip and the percentage of cells presenting podosomes was calculated. Values are means ± SEM from three separate experiments.

(Hai et al., 2002), may represent an important feature of cell types forming blood vessels. These findings open up a new field of investigation in terms of vascular biology.

### Acknowledgements

We thank Drs. C. Chaponnier (Geneva, Switzerland), M. McNiven (Rochester, USA), J. Saklatvala (London,

UK), D. Cantrell (London, UK), D. Stewart (Bethesda, USA), M. Way (London, UK), and M. Welch (Berkeley, USA) for providing cell lines, constructs and antibodies. We thank Prof. I. Kramer for critical reading of the manuscript. F. Tatin and C. Varon were supported by predoctoral fellowships from the “Region Aquitaine” and “Association pour la Recherche sur le Cancer” and the “Ligue contre le Cancer”, respectively, G. Anies, from the French Ministry of Education, Research and Technology. This work was supported by grants from INSERM, the Association pour la Recherche contre le Cancer (contract no. 4787) and La Ligue Nationale contre le Cancer (Comité régional Dordogne).

### References

- Burgstaller, G., Gimona, M., 2004. Actin cytoskeleton remodelling via local inhibition of contractility at discrete microdomains. *J. Cell Sci.* 117, 223–231.
- Choi, K., Kennedy, M., Kazarov, A., Papadimitriou, J.C., Keller, G., 1998. A common precursor for hematopoietic and endothelial cells. *Development* 125, 725–732.
- Davis, W., Stephens, L.R., Hawkins, P.T., Saklatvala, J., 1999. Synergistic activation of JNK/SAPK by interleukin-1 and platelet-derived growth factor is independent of Rac and Cdc42. *Biochem. J.* 338, 387–392.
- DeFife, K.M., Jenney, C.R., Colton, E., Anderson, J.M., 1999. Cytoskeletal and adhesive structural polarizations accompany IL-13-induced human macrophage fusion. *J. Histochem. Cytochem.* 47, 65–74.
- Dutartre, H., Davoust, J., Gorvel, J.P., Chavrier, P., 1996. Cytokinesis arrest and redistribution of actin-cytoskeleton regulatory components in cells expressing the Rho GTPase CDC42Hs. *J. Cell Sci.* 109, 367–377.
- Gadea, G., Roger, L., Anguille, C., de Toledo, M., Gire, V., Roux, P., 2004. TNF $\alpha$  induces sequential activation of Cdc42- and p38/p53-dependent pathways that antagonistically regulate filopodia formation. *J. Cell Sci.* 117, 6355–6364.
- Hai, C.M., Hahne, P., Harrington, E.O., Gimona, M., 2002. Conventional protein kinase C mediates phorbol-dibutyrate-induced cytoskeletal remodeling in a7r5 smooth muscle cells. *Exp. Cell Res.* 280, 64–74.
- Imai, K., Kijima, T., Noda, Y., Sutoh, K., Yoda, K., Adachi, H., 2002. A Rho GDP-dissociation inhibitor is involved in cytokinesis of *Dictyostelium*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 296, 305–312.
- Lakkakorpi, P.T., Wesolowski, G., Zimolo, Z., Rodan, G.A., Rodan, S.B., 1997. Phosphatidylinositol 3-kinase association with the osteoclast cytoskeleton, and its involvement in osteoclast attachment and spreading. *Exp. Cell Res.* 237, 296–306.
- Li, S., Chen, B.P., Azuma, N., Hu, Y.L., Wu, S.Z., Sumpio, B.E., Shyy, J.Y., Chien, S., 1999. Distinct roles for the small GTPases Cdc42 and Rho in endothelial responses to shear stress. *J. Clin. Invest.* 103, 1141–1150.

- Linder, S., Aepfelbacher, M., 2003. Podosomes: adhesion hot-spots of invasive cells. *Trends Cell Biol.* 13, 376–385.
- Linder, S., Nelson, D., Weiss, M., Aepfelbacher, M., 1999. Wiskott-Aldrich syndrome protein regulates podosomes in primary human macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 9648–9653.
- Linder, S., Hufner, K., Wintergerst, U., Aepfelbacher, M., 2000. Microtubule-dependent formation of podosomal adhesion structures in primary human macrophages. *J. Cell Sci.* 113, 4165–4176.
- Marchisio, P.C., Cirillo, D., Teti, A., Zamboni-Zallone, A., Tarone, G., 1987. Rous sarcoma virus-transformed fibroblasts and cells of monocytic cell origin display a peculiar dot-like organization of cytoskeletal proteins involved in microfilament-membrane interactions. *Exp. Cell Res.* 169, 202–214.
- Mizutani, K., Miki, H., He, H., Manita, H., Takenawa, T., 2002. Essential role of neural Wiskott-Aldrich syndrome protein in podosome formation and degradation of extracellular matrix in src-transformed fibroblasts. *Cancer Res.* 62, 669–674.
- Moreau, V., Tatin, F., Varon, C., Génot, E., 2003. Actin can reorganize into podosomes in aortic endothelial cells, a process controlled by Cdc42 and RhoA. *Mol. Cell. Biol.* 23, 6809–6822.
- Muris, D., Verschoor, T., Divecha, N., Michalides, R.J., 2002. Constitutive active GTPases Rac and Cdc42 are associated with endoreplication in PAE cells. *Eur. J. Cancer* 38, 1175–1182.
- Ochoa, G., Slepnev, V., Neff, L., Ringstad, N., Takei, K., Daniell, L., Kim, W., Cao, H., McNiven, M., Baron, R., Camilli, P.D., 2000. A functional link between dynamin and the actin cytoskeleton at podosomes. *J. Cell Biol.* 150, 377–389.
- Osman, M.A., Cerione, R.A., 1998. Iqg1p, a yeast homologue of the mammalian IQGAPs, mediates cdc42p effects on the actin cytoskeleton. *J. Cell Biol.* 142, 443–455.
- Parast, M.M., Aeder, S., Sutherland, A.E., 2001. Trophoblast giant-cell differentiation involves changes in cytoskeleton and cell motility. *Dev. Biol.* 230, 43–60.
- Pfaff, M., Jurdic, P., 2001. Podosomes in osteoclast-like cells: structural analysis and cooperative roles of paxillin, proline-rich tyrosine kinase 2 (Pyk2) and integrin alphaV-beta3. *J. Cell Sci.* 114, 2775–2786.
- Sanjay, A., Houghton, A., Neff, L., DiDomenico, E., Bardelay, C., Antoine, E., Levy, J., Gailit, J., Bowtell, D., Horne, W.C., Baron, R., 2001. Cbl associates with Pyk2 and Src to regulate Src kinase activity, alpha(v)beta(3) integrin-mediated signaling, cell adhesion, and osteoclast motility. *J. Cell Biol.* 152, 181–195.
- Schuuring, E., Verhoeven, E., Litvinov, S., Michalides, R.J., 1993. The product of the FMS1 gene, amplified and overexpressed in human carcinomas, is homologous to a v-src substrate and is located in cell-substratum contact sites. *Mol. Cell. Biol.* 13, 2891–2898.
- Tarone, G., Cirillo, D., Giancotti, F., Comoglio, P., Marchisio, P., 1985. Rous sarcoma virus-transformed fibroblasts adhere primarily at discrete protrusions of the ventral membrane called podosomes. *Exp. Cell Res.* 159, 141–157.
- Weston, C.A., Anova, L., Rialas, C., Prives, J.M., Weeks, B.S., 2000. Laminin-1 activates Cdc42 in the mechanism of laminin-1-mediated neurite outgrowth. *Exp. Cell Res.* 260, 374–378.

#### **4. Quatrième partie : La PI3K et son rôle dans l'adhérence cellulaire, fonction des podosomes.**

La PI3K est impliquée dans les réarrangements de l'actine, la formation des ruffles suite à l'activation par le récepteur au PDGF est sous la dépendance de la PI3K et de la GTPase Rac. La sous-unité régulatrice P85 de la PI3K est importante dans la régulation du cytosquelette d'actine et en particulier la partie amino terminale de P85 (Jimenez, Portela et al. 2000; Hill, Huang et al. 2001) ; cette partie comporte le domaine BH capable d'interagir avec Rac ou Cdc42. De plus, un lien est établi entre la sous-unité P85 et Cdc42 pour la formation des ruffles après stimulation au PDGF. La présence de la sous-unité P85 $\alpha$  dans les podosomes a été décrite dans le modèle des ostéoclastes (Lakkakorpi, Wesolowski et al. 1997).

Ces données nous ont incités à étudier la PI3K et ses sous-unités régulatrices P85 lors de la formation des podosomes dans le modèle PAEV12Cdc42.

***(1) Etude du rôle de la PI3K dans la formation et la fonction des podosomes***

**(a) Localisation de la PI3K au niveau des podosomes**

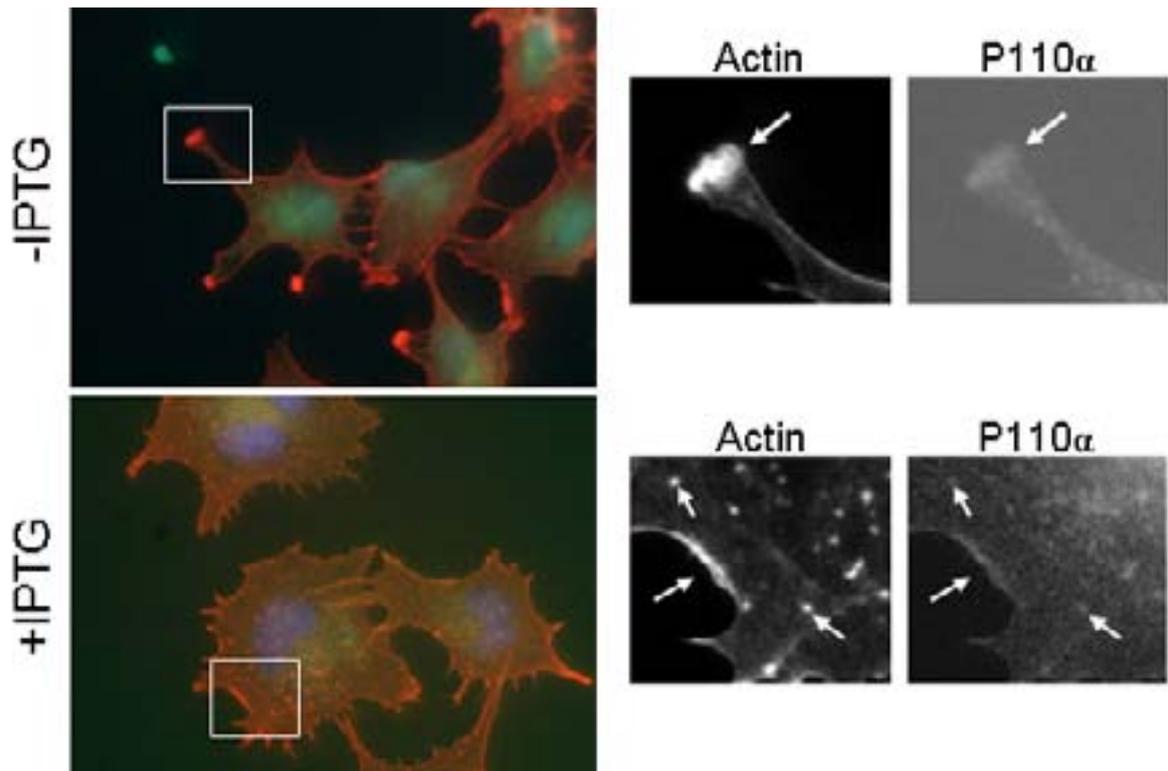
J'ai analysé la localisation cellulaire de la PI3K. Nous avons étudié la localisation de la sous-unité P85 (isoforme alpha et beta) ainsi que la localisation de la sous-unité régulatrice P110 alpha dans le modèle PAEV12Cdc42.

- Marquage de P110 alpha dans les PAEV12Cdc42

La sous-unité catalytique P110 $\alpha$  a une localisation cytosolique avec une accumulation au niveau de « ruffles », on peut la détecter aussi le long des fibres de stress. Après formation des podosomes par l'ajout d'IPTG, P110 va être détectée au niveau des podosomes (Figure 34).

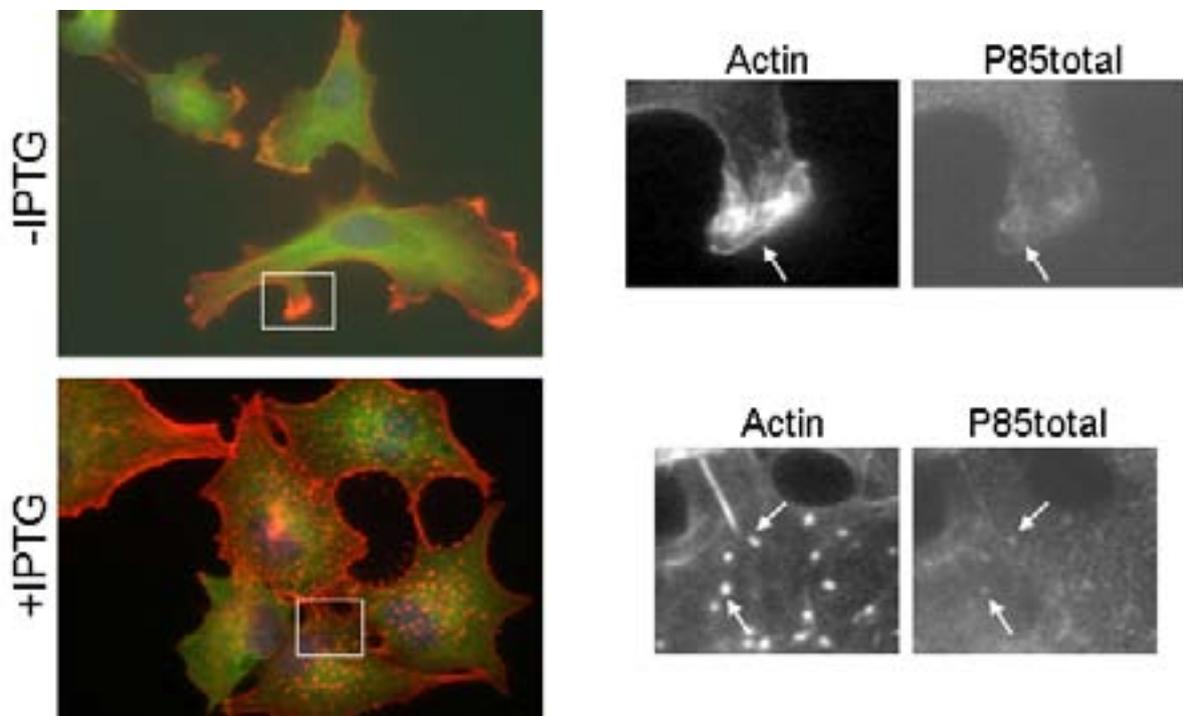
- Localisation des sous-unités P85 dans le modèle PAEV12Cdc42 :

L'anticorps P85 (Upstate, 06-497) est un anticorps polyclonal qui reconnaît l'ensemble des sous-unités P85. Les sous-unités P85 sont localisées au niveau du cytoplasme avec une accumulation péri-nucléaire et aussi au niveau des ruffles membranaires. Suite à l'induction avec l'IPTG, les cellules forment des podosomes, il y a alors relocalisation des sous-unités P85 au niveau des podosomes comme le montre la Figure 35.



**Figure 34 Localisation de la sous-unité P110 $\alpha$  aux podosomes dans le modèle PAEV12Cdc42.**

Les podosomes sont visualisés par un marquage fluorescent de la F-actine (Rhodamine-phalloïdine), les protéines P110 $\alpha$  sont détectées en vert par un marquage avec l'Ac anti-P110 $\alpha$  (Upstate). Les noyaux sont visualisés par un marquage par le colorant : Hoescht.



**Figure 35 Localisation des sous-unités P85 aux podosomes dans le modèle PAEV12Cdc42.**

Les podosomes sont visualisés par un marquage fluorescent de la F-actine (Rhodamine-phalloïdine), les protéines P85 totales sont détectées en vert par un marquage avec l'Ac anti-P85 (Upstate, 06-497). Les noyaux sont visualisés par un marquage par le colorant : Hoescht.

**Résultats-Discussion : Quatrième Partie** « *La PI3K et son rôle dans l'adhérence cellulaire, fonction des podosomes.* »

Par la suite et pour savoir quelles sous-unités étaient localisées aux podosomes, j'ai utilisé deux anticorps anti-P85 $\alpha$  clone U5 et anti-P85 $\beta$  clone T15 qui respectivement reconnaissent spécifiquement la sous-unité P85 $\alpha$  et P85 $\beta$ .

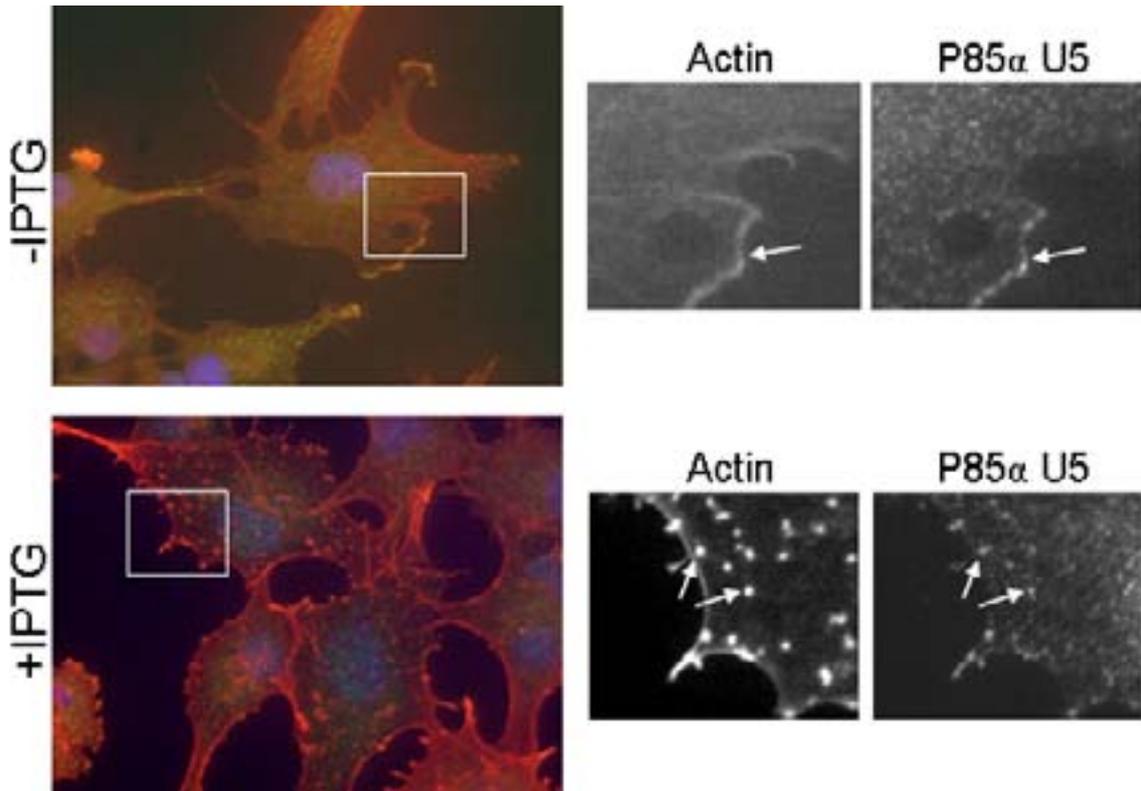
- Localisation de la sous-unité P85 $\alpha$  dans le modèle PAEV12Cdc42 :

La sous-unité P85 $\alpha$  est localisée au niveau cytosolique et aussi au niveau des « ruffles » membranaires. Après formation des podosomes, suite à l'ajout d'IPTG, P85 $\alpha$  va se relocaliser au niveau des podosomes (Figure 36).

- Localisation de la sous-unité P85 $\beta$  dans le modèle PAEV12Cdc42 :

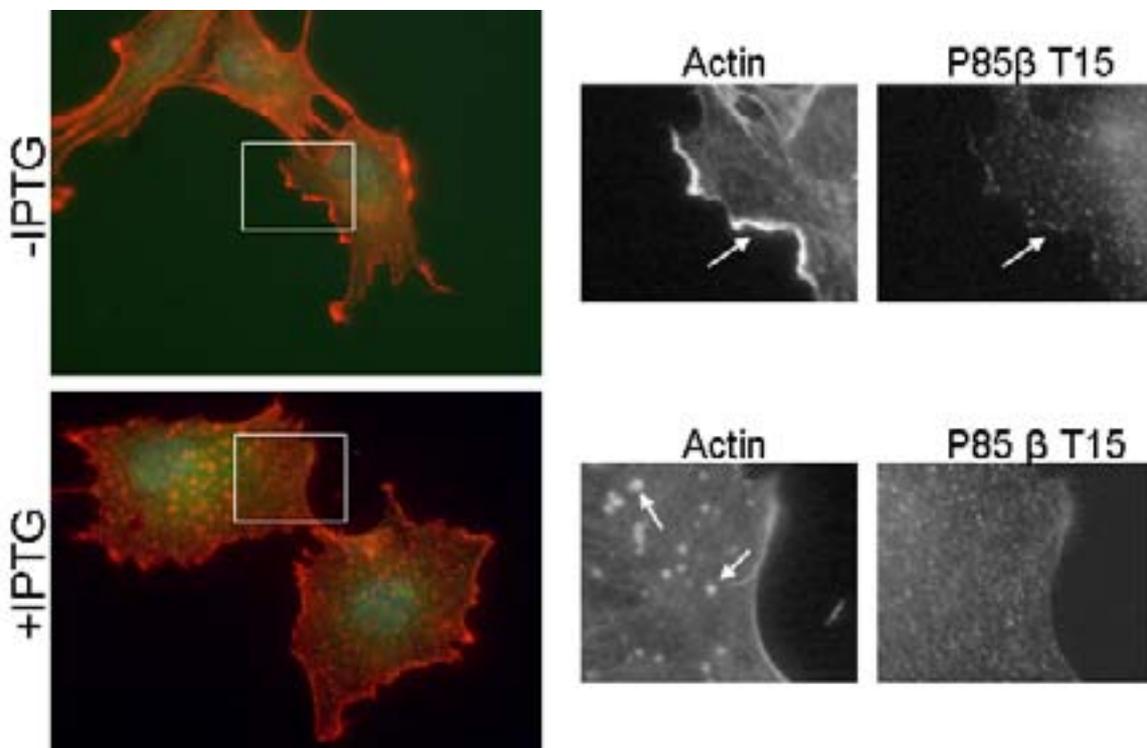
La sous-unité P85 $\beta$  est localisée au niveau cytosolique de façon ponctiforme qui suggère une localisation au niveau de vésicules, elle est aussi localisée faiblement au niveau des « ruffles » membranaires. Après formation des podosomes, suite à l'ajout d'IPTG, P85 $\beta$  reste cytosolique avec une distribution identique à la condition non induite. Il n'y a pas de relocalisation de P85 $\beta$  au niveau des podosomes (Figure 37).

Il semble qu'il y est une spécificité pour la localisation des sous-unités régulatrices de la PI3K de classe Ia au niveau des podosomes en la faveur de P85 $\alpha$ . Néanmoins, d'après ce qui est décrit dans la littérature (Otsu, Hiles et al. 1991), la sous-unité P85 $\beta$  est beaucoup moins exprimée que l'isoforme alpha. De ce fait, il se peut que l'isoforme P85 $\beta$  puisse être recrutée aux podosomes mais qu'elle ne soit pas suffisamment abondante pour qu'on puisse l'y détecter. Afin de répondre clairement à cette question, j'ai entrepris d'analyser la localisation des protéines exogènes HA-P85 $\alpha$  et HA-P85 $\beta$ .



**Figure 36 Localisation de la sous-unité P85 $\alpha$  aux podosomes dans le modèle PAEV12Cdc42.**

Les podosomes sont visualisés par un marquage fluorescent de la F-actine (Rhodamine-phalloïdine), les protéines P85 $\alpha$  sont détectées en vert par un marquage avec l'Ac anti-P85  $\alpha$  (U5). Les noyaux sont visualisés par un marquage par le colorant : Hoescht.



**Figure 37 La sous-unité P85 $\beta$  n'est pas localisée aux podosomes dans le modèle PAEV12Cdc42.**

Les podosomes sont visualisés par un marquage fluorescent de la F-actine (Rhodamine-phalloïdine), les protéines P85 $\beta$  sont détectées en vert par un marquage avec l'Ac anti-P85 $\beta$  (T15). Les noyaux sont visualisés par un marquage par le colorant : Hoescht.

**Résultats-Discussion : Quatrième Partie** « *La PI3K et son rôle dans l'adhérence cellulaire, fonction des podosomes.* »

- Localisation des protéines exogènes HA-P85 $\alpha$  et HA-P85 $\beta$  : conclusions sur une spécificité de localisation des sous-unités P85 aux podosomes.

Afin de vérifier s'il y a bien une spécificité de recrutement des sous-unités P85, j'ai transfecté des formes étiquetées avec l'étiquette HA dans les PAEV12Cdc42. Dans ce cas après formation des podosomes, on peut noter que les deux isoformes HA-P85 $\alpha$  et HA-P85 $\beta$  sont recrutées aux podosomes (voir Figure 38).

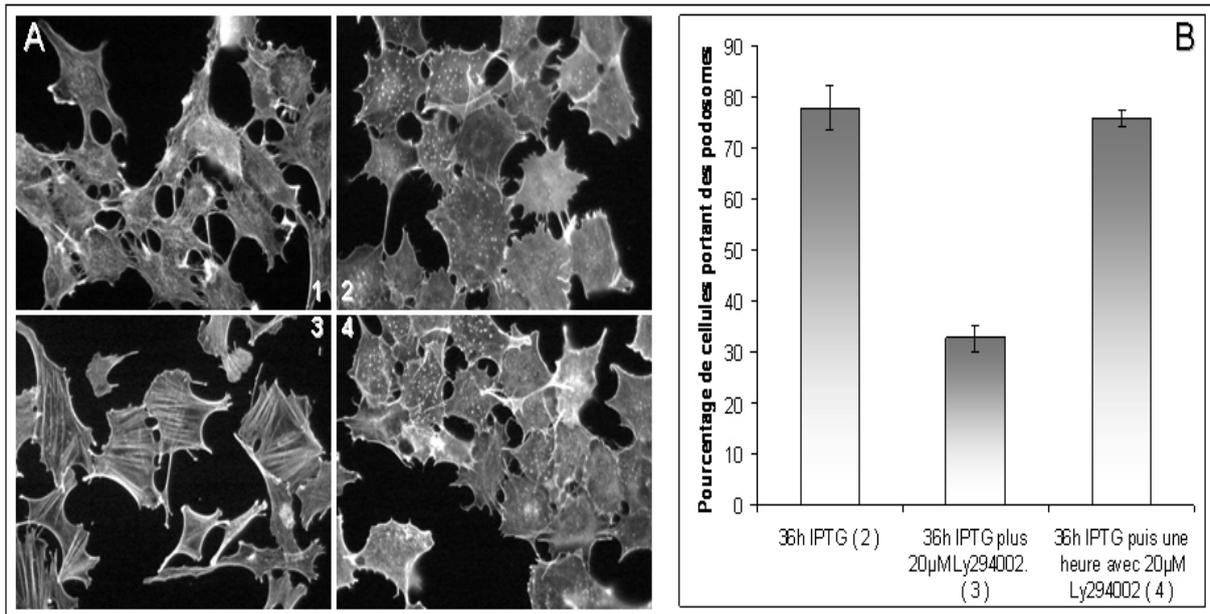
---

**Figure 38 Recrutement des formes exogènes HA-P85 $\alpha$  et HA-P85 $\beta$  aux podosomes V12cdc42.** Les cellules PAEV12Cdc42 ont été transfectées avec le plasmide codant soit pour HA-P85 $\alpha$  soit pour HA-P85 $\beta$  (20  $\mu$ g d'ADN dans chaque cas). 12 heures après la transfection, les cellules sont stimulées avec l'IPTG pendant 24h puis fixées. Les podosomes sont visualisés par un marquage fluorescent de la F-actine (Rhodamine-phalloïdine), les protéines étiquetées avec l'hémagglutinine sont détectées en vert par un marquage avec l'Ac anti-HA (12C5A). Les noyaux sont visualisés par un marquage par le colorant : Hoesht.

Il n'y a donc pas de spécificité de recrutement des isoformes P85 au niveau des podosomes. L'absence de la protéine endogène P85 $\beta$  au niveau des podosomes peut s'expliquer par le fait que cette protéine est moins exprimée que l'isoforme alpha et donc on ne la détecte pas aux podosomes.

**(b) La PI3K est nécessaire à la formation des podosomes**

Après avoir montré la présence de la sous-unité régulatrice P85 et de la sous-unité catalytique P110 $\alpha$  au niveau des podosomes, nous nous sommes demandé si l'activité de la PI3K était utile pour la formation et ou, le maintien des podosomes. Pour répondre à cette question nous avons utilisé l'inhibiteur pharmacologique des PI3K, le Ly294002. Les cellules ont été traitées avec le Ly294002 pendant la stimulation à l'IPTG pour répondre à la question de l'implication de la PI3K dans la formation des podosomes. Les cellules ont aussi été traitées suite à la stimulation à l'IPTG (36h) afin de savoir si la PI3K était impliquée dans le maintien des podosomes. Les résultats sont présentés dans la Figure 39. Suite à la stimulation pendant 36h par l'IPTG, environ 80% des PAEV12Cdc42 portent des podosomes (Figure 39A2 et Figure 39B), ce chiffre tombe à près de 30% si pendant l'induction par l'IPTG, 20 $\mu$ M de Ly ont été ajoutés (Figure 39A3 et Figure 39B). Par contre on obtient toujours environ 80% de cellules portant des podosomes si 20 $\mu$ M de Ly (pendant 1 heure) sont ajoutés au terme des 36h d'induction (Figure 39A4 et Figure 39B).



**Figure 39** L'inhibiteur des PI3K, Ly294002, empêche la formation des podosomes. **A)** La formation des podosomes dans les PAEV12Cdc42 est induite par l'IPTG, les cellules sont fixées après 36h. Les podosomes sont visualisés par un marquage fluorescent de la F-actine (Rhodamine-phalloïdine). 1) PAEV12Cdc42 non induite par l'IPTG, 2) PAE induite 36h par l'IPTG, 3) PAE induite 36h par l'IPTG + Ly294002 20 µM, 4) PAE induite 36h par l'IPTG puis 1h de traitement au Ly294002 20µM. **B)** Pourcentage de cellules portant des podosomes en fonction des traitements, 500 cellules comptées par lamelle, les valeurs représentent la moyenne de 3 expériences.

On peut conclure que l'activité de la PI3K est indispensable à la formation des podosomes induit par la GTPase V12Cdc42 dans le modèle des PAEV12Cdc42. A contrario, cette activité n'est pas requise pour le maintien de ces podosomes. La PI3K inactivée par l'inhibiteur reste associée aux podosomes (voir Figure 34 et Figure 36). Je pense que la PI3K restant associée aux podosomes, après avoir servi à leur formation, va être impliquée dans la fonction liée aux podosomes.

La formation des podosomes dans ce modèle cellulaire est induit pas la GTPase Cdc42 et est dépendante de l'activité PI3K. Ceci constitue un nouveau modèle où les GTPases sont en amont de la PI3K afin de réguler son activité. Cdc42 tout comme Rac a la possibilité de se lier à la sous-unité P85 de la PI3K, cette interaction est-elle importante lors de la formation des podosomes?

**(c) Mécanismes d'action de la PI3K lors de la formation des podosomes.**

(i) Localisation des domaines BH isolés et leurs effets sur la formation des podosomes.

J'ai pu montrer que le domaine BH de P85 $\alpha$  (mais pas P85 $\beta$ ) peut interagir avec Cdc42 (cf. chapitre 3) ; on sait que dans le modèle cellulaire des PAE, les podosomes sont induits de façon Cdc42 dépendante et PI3K dépendante. Nous avons posé l'hypothèse qu'il pourrait y avoir un lien entre Cdc42 et la PI3K dans l'induction de la formation des podosomes. Nous supposons que Cdc42 entraînerait la formation des podosomes par le biais d'une activation de la PI3K. Cette activation pouvant être une régulation spatiale ou une régulation de l'activité catalytique de la PI3K. Dans cette hypothèse, Cdc42 régulerait la PI3K via une interaction de Cdc42 avec le domaine BH de la sous-unité régulatrice P85.

Afin de tester cette hypothèse, nous avons surexprimé les domaines BH des isoformes P85 $\alpha$  et P85 $\beta$  dans les PAEV12Cdc42 et nous avons recherché si ces cellules étaient toujours capables de former des podosomes. En effet, nous supposons, dans le cadre de notre hypothèse, que le domaine BH va agir comme un inhibiteur qui empêche l'interaction entre Cdc42 et les isoformes de P85 endogènes et qui va donc inhiber la formation des podosomes. Les résultats sont présentés dans la Figure 40.

---

**Figure 40 Effet des domaines BH isolés sur la formation des podosomes.** Des cellules PAEV12Cdc42 ont été transfectées soit avec la construction HA-«new»BH $\alpha$  soit avec HA-«new»BH $\beta$ . 12 heures après la transfection, les cellules sont stimulées avec l'IPTG pendant 24h puis fixées. Les podosomes sont visualisés par un marquage fluorescent de la F-actine (Rhodamine-phalloïdine), les protéines étiquetées avec l'hémagglutinine sont détectées en vert par un marquage avec l'Ac anti-HA (12C5A). Le diagramme représente le pourcentage de cellules portant des podosomes parmi les cellules transfectées (HA-«new»BH $\alpha$  ou HA-«new»BH $\beta$ ) ramené au contrôle.

Les domaines BH sont incapables d'inhiber de façon significative la formation des podosomes induite par Cdc42 sous sa forme active.

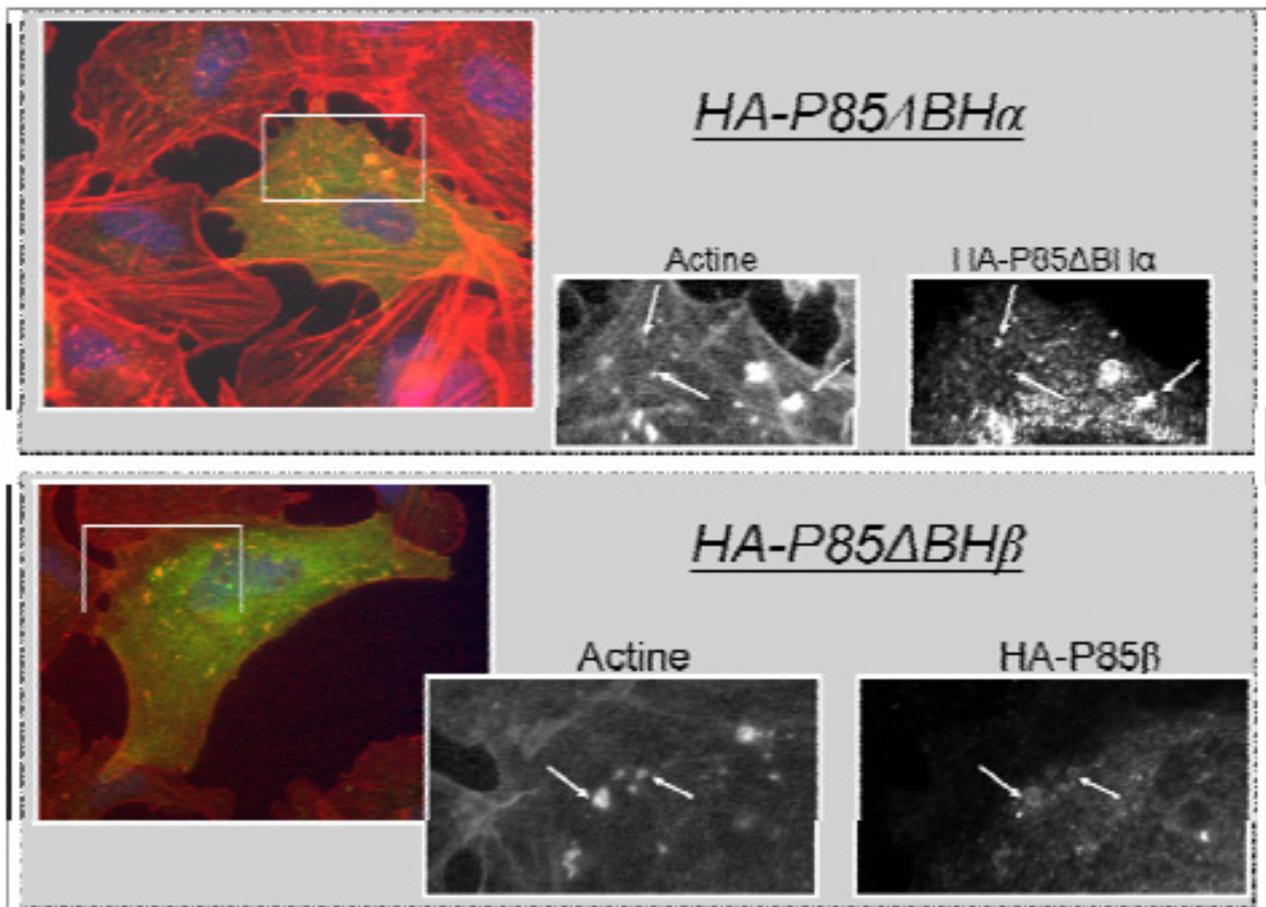
Pour expliquer ce résultat, on peut tout d'abord imaginer que la formation des podosomes induite par Cdc42 et dépendante de la PI3K n'est pas dépendante d'une interaction entre Cdc42 et le domaine BH de P85, ou alors, on peut penser que la quantité de protéines BH exprimées dans la cellule n'est pas suffisante pour inhiber la formation des podosomes.

En effet, pour former les podosomes, il est nécessaire de surexprimer la protéine Cdc42 ; le système utilisé passe par une induction via l'IPTG. Il est possible qu'il existe un seuil, en quantité de protéines Cdc42 actives, qu'il est nécessaire d'atteindre pour former des podosomes et que dans nos conditions nous soyons bien au delà de ce seuil. Peut-être que le domaine BH inhibe une partie de l'effet de Cdc42 mais malgré cela nous sommes toujours au dessus du seuil nécessaire à la formation des podosomes.

Il serait peut-être intéressant de déterminer ce seuil et dans ces conditions de tester à nouveau l'effet que peut avoir les domaines BH sur la formation des podosomes.

(ii) Etude de la localisation des mutants p85 délétés du domaine BH aux podosomes.

J'ai recherché si le domaine BH était nécessaire à la localisation de la sous-unité P85. La protéine Cdc42 localise aux podosomes, j'ai supposé que Cdc42 pourrait permettre la localisation de la PI3K aux podosomes via son interaction avec le domaine BH de P85. On peut noter que les formes mutées où le domaine BH est absent HA-P85 $\Delta$ BH $\alpha$  et HA-P85 $\Delta$ BH $\beta$  sont localisées aux podosomes (voir Figure 41). Le domaine BH n'est pas nécessaire à la localisation de P85 aux podosomes.



**Figure 41 Recrutement des formes exogènes HA-P85 $\Delta$ BH $\alpha$  et HA-P85 $\Delta$ BH $\beta$  aux podosomes V12cdc42.** Les cellules PAEV12Cdc42 ont été transfectées avec le plasmide codant soit pour HA-P85 $\Delta$ BH $\alpha$  soit pour HA-P85 $\Delta$ BH $\beta$  (20  $\mu$ g d'ADN dans chaque cas). 12 heures après la transfection, les cellules sont stimulées avec l'IPTG pendant 24h puis fixées. Les podosomes sont visualisés par un marquage fluorescent de la F-actine (Rhodamine-phalloïdine), les protéines étiquetées avec l'hémagglutinine sont détectées en vert par un marquage avec l'Ac anti-HA (12C5A). Les noyaux sont visualisés par un marquage par le colorant : Hoesht.

**(2) Discussion sur le rôle de la PI3K dans la formation des podosomes.**

Ce travail a permis de montrer l'importance de la PI3K dans la formation d'une structure d'adhérence que sont les podosomes dans le modèle endothélial les PAEV12Cdc42. La formation des podosomes constitue également un nouveau modèle d'étude de régulation de la PI3K par les GTPases dans ce cas, la protéine Cdc42.

• **Rôle de la PI3K dans la formation des podosomes :**

La GTPase Cdc42 pourrait permettre de créer avec la PI3K les sites d'initiation des podosomes. Il a été montré que Cdc42 pouvait permettre l'activation de la PI3K et ceci induisait une accumulation de PIP3 aux membranes à certains sites précis (Srinivasan, Wang et al. 2003). Aussi Cdc42 est localisée aux podosomes. Cdc42 pourrait recruter la PI3K et l'activer ; des domaines membranaires enrichis en PIP3 constitueraient les futurs podosomes. Pour appuyer cette hypothèse, il a été montré que les PIP3 permettent de recruter la gelsoline (Chellaiah, Biswas et al. 2001). La gelsoline est une protéine localisée aux podosomes (Moreau, Tatin et al. 2006). Ainsi recrutée la gelsoline va favoriser le processus d'élongation des filaments d'actine (Chellaiah and Hruska 1996). Ceci permettrait alors la formation de l'anneau d'actine caractéristique des podosomes.

• **Régulation de la PI3K et Cdc42 :**

La formation des podosomes dans les cellules PAEV12Cdc42 est dépendante de la PI3K. Nous montrons que la formation des podosomes dans les cellules PAE constitue un nouveau modèle où une GTPase, Cdc42, agit en amont de la PI3K. Dans la littérature, il est déjà décrit que Cdc42 peut directement induire l'activation de la PI3K in vitro (Zheng, Bagrodia et al. 1994) et in vivo (Keely, Westwick et al. 1997).

Nous avons émis l'hypothèse que lors de la formation des podosomes, Cdc42 pourrait interagir avec P85 afin de recruter la PI3K ou bien de l'activer. Dans le cadre de cette hypothèse, nous nous sommes donc naturellement demandé si le domaine BH de la sous-unité P85 permettait de faire le lien entre la PI3K et Cdc42.

D'une part, j'ai pu montrer que les mutants P85, dépourvus du domaine BH, pouvaient toujours être recrutés aux podosomes. Ce résultat suggère que Cdc42 ne serait pas directement nécessaire au recrutement de la PI3K via son interaction avec P85.

**Résultats-Discussion : Quatrième Partie** « *La PI3K et son rôle dans l'adhérence cellulaire, fonction des podosomes.* »

D'autre part, j'ai testé si les domaines BH isolés pouvaient être des inhibiteurs de la formation des podosomes induite par Cdc42 ; j'ai montré que l'utilisation de ces domaines n'entraînait pas d'inhibition significative ; ces deux résultats suggèrent que le domaine BH et donc l'interaction Cdc42-P85 ne serait pas indispensable dans le processus de formation des podosomes.

Cependant, pour être affirmatif, il serait nécessaire d'appréhender le problème par une nouvelle approche et l'utilisation des ARN interférents pourrait être une solution. Seuls les isoformes les plus longs, P85 $\alpha$  et P85 $\beta$ , portent une partie amino terminale supplémentaire contenant entre autre le domaine BH. En « éteignant » l'expression de ces deux isoformes nous pourrions vérifier que les isoformes les plus courts, P50 $\alpha$ , P55 $\alpha$  et P55 $\gamma$ , sont incapables de compléter la fonction de P85 $\alpha$  et P85 $\beta$  pour la formation des podosomes et ainsi nous pourrions montrer que la partie amino terminale est cruciale pour ces événements. Pour démontrer que le domaine BH est indispensable lors de la formation des podosomes suite à l'activation par Cdc42, je vérifierais que la transfection d'une construction P85 $\Delta$ BH est incapable de restaurer la formation des podosomes, dans des cellules où l'expression P85 $\alpha$  et P85 $\beta$  est inhibée par ARN interférents. Par cette technique d'ARN interférents, nous pourrions ainsi vérifier s'il existe une spécificité entre l'isoforme P85 $\alpha$  et P85 $\beta$  pour la formation des podosomes.



## **5. Cinquième Partie : PI3K, étude d'un nouveau mécanisme de régulation.**

Ce cours chapitre traite de la possibilité d'une régulation de la PI3K par le biais d'une homodimérisation de la sous-unité P85. En effet, il a été montré que l'isoforme P85 $\alpha$  est capable de s'homodimériser in-vitro (Harpur, Layton et al. 1999). Cette homodimérisation, encore jamais démontré in-vivo, ferait intervenir, entre autres, une interaction entre les domaines BH. Dans ce chapitre, je fais la synthèse des expériences mises en œuvre pour tenter d'établir l'existence de la dimérisation des sous-unités P85.

Afin d'étudier les interactions entre les isoformes P85, j'ai réalisé deux types d'approches : la réalisation de gels non dénaturants puis l'utilisation de la technique de spectrométrie de Masse.

**a) Gels non dénaturants**

Cette approche de gels non dénaturants permet de conserver les interactions lors de l'électrophorèse des protéines. J'ai ainsi pu rechercher si les isoformes de P85 pouvaient former des complexes.

***(1) Les domaines BH isolés forment des homodimères***

Dans un premier temps, je me suis intéressé aux domaines BH isolés. L'article de Aisla Harpur, (Harpur, Layton et al. 1999), a montré que l'isoforme P85 $\alpha$  peut s'homodimériser. Cette homodimérisation passe par les domaines SH3 et les boîtes riches en proline, mais aussi, par une interaction entre les domaines BH.

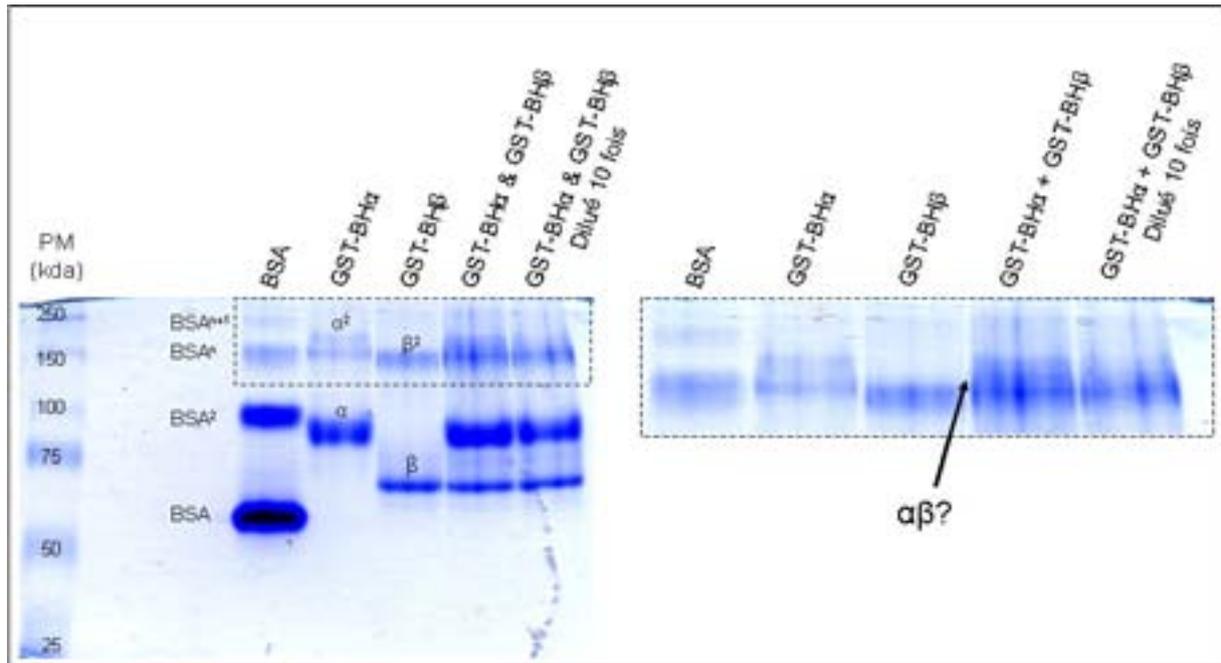
Par l'approche des gels non dénaturants, j'ai essayé de valider l'interaction BH $\alpha$  -BH $\alpha$  pour l'isoforme P85 $\alpha$  et j'ai également cherché si le domaine BH de P85 $\beta$ , très différent de l'isoforme P85 $\alpha$ , pouvait lui aussi s'homodimériser.

Les tests d'homodimérisation ont été réalisés avec des protéines chimériques GST-BH $\alpha$  ou GST-BH $\beta$ . Les protéines ont été exprimées chez la bactérie *E.Coli* et la purification de ces protéines a été réalisée selon le protocole décrit dans le chapitre résultats. Les protéines, après purification sur billes, ont été éluées puis dialysées (voir Matériel et Méthodes).

L'équivalent de 10  $\mu$ g de protéines (concentration de 1  $\mu$ g/ $\mu$ l) a été incubé dans du PBS, 5 min à température ambiante. Les protéines sont alors reprises dans du tampon de charge non dénaturant et déposées sur un gel d'acrylamide non dénaturant. Les protéines sont ensuite détectées soit par coloration du gel avec le bleu de Coomassie, soit par Western-Blot, après transfert sur membrane de PVDF. Les résultats sont présentés dans la Figure 42 et la Figure 43.

On peut observer dans la piste GST-BH $\alpha$ , ainsi que dans la piste GST-BH $\beta$  (voir Figure 42) la présence de deux bandes majoritaires. Ces bandes pourraient correspondre à un monomère de GST-BH $\alpha$  (marqué  $\alpha$  sur la figure) et à un dimère de GST-BH $\alpha$  (marqué  $\alpha^2$  sur la figure), de même pour GST-BH $\beta$ .

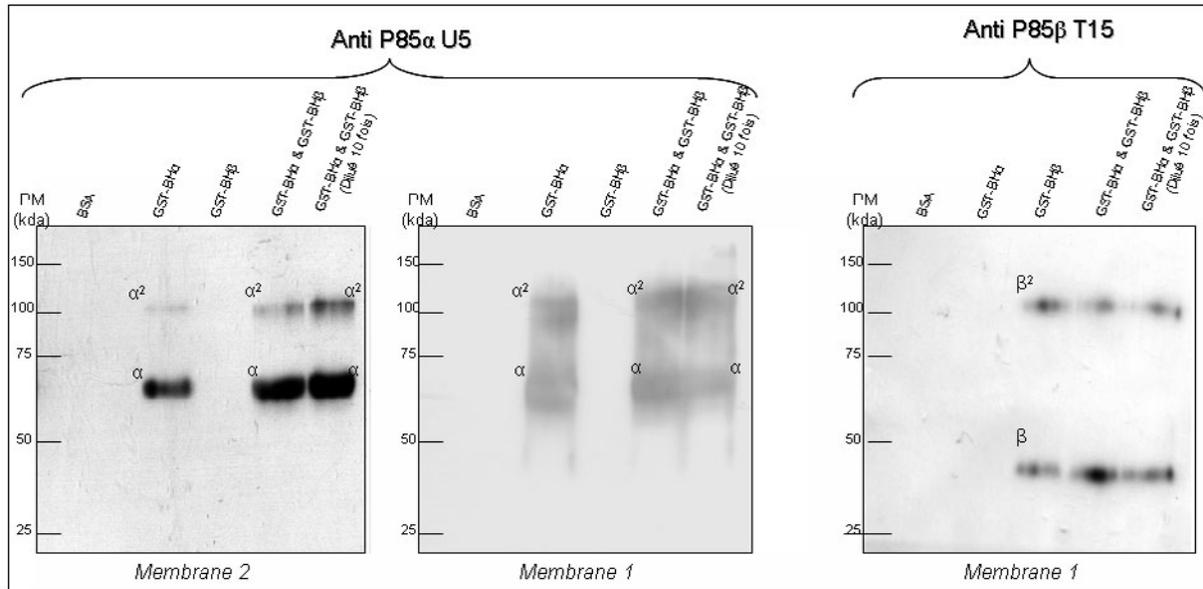
***Résultats-Discussion : Cinquième Partie*** «Cinquième Partie : PI3K, étude d'un nouveau mécanisme de régulation.»



**Figure 42 GELS NON DENATURANTS**, les échantillons ont été déposés sur un gel d'acrylamide 10%. L'équivalent de 10 $\mu$ g de protéines a été déposé par puits. Les pistes « GST-BH $\alpha$  et GST-BH $\beta$  » correspondent à un mélange de ces deux protéines avant migration.

*Remarque : Les marqueurs de poids moléculaire n'ont été ajoutés ici que comme témoin de migration, en aucuns cas on ne peut se référer à ceux-ci pour estimer des poids moléculaires apparents.*

L'identité des bandes observée par coloration au bleu de Coomassie a été cherchée par western-blot (Voir Figure 43). L'utilisation de l'anticorps anti-P85 $\alpha$  U5 détecte de manière spécifique les deux bandes majoritaires vues en bleu de Coomassie. De même, l'anticorps anti-P85 $\beta$  T15 détecte de manière spécifique les deux bandes majoritaires dans les pistes GST-BH $\beta$ .



**Figure 43 GELS NON DENATURANTS.** Western-Blot. L'équivalent de 10μg de protéines a été déposé par puits. Les pistes « GST-BHα et GST-BHβ » correspondent à un mélange de ces deux protéines avant migration.

Par ces expériences de gels non dénaturants, j'ai pu montrer que les protéines GST-BHα et GST-BHβ pouvaient former des multimères. D'après le profil de migration et aussi d'après la littérature (Musacchio, Cantley et al. 1996; Harpur, Layton et al. 1999), il semble que l'on soit en présence d'un dimère de GST-BHα et d'un dimère de GST-BHβ.

La question d'un hétérodimère GST-BHα-GST-BHβ reste à discuter, en effet dans la condition «GST-BHα + GST-BHβ», on peut percevoir une bande de faible intensité qui s'intercale entre les homodimères de chaque espèce (Figure 42). Cette bande pourrait correspondre à un hétérodimère. Dans ces expériences, je n'ai pas été en mesure d'obtenir une meilleure résolution pour visualiser cette bande. Je ne peux donc pas conclure définitivement sur son identité et donc sur l'existence d'un hétérodimère GST-BHα-GST-BHβ.

Dans cette expérience il manque le contrôle indispensable que serait la GST nous permettant d'exclure que la dimérisation passe par la GST. J'ai tout de même un début de réponse mais qui ne saurait combler l'absence de ce contrôle. Si on pense que la dimérisation est induite par la GST et non par les constructions elles-même, nous devrions dans le cas où l'on mélange GST-BHα et GST-BHβ trouver une distribution équimolaire des dimères (GST-BHα)<sup>2</sup>, (GST-BHβ)<sup>2</sup> et de l'hétérodimère (GST-BHα-GST-BHβ). Si l'on regarde le coomassie (Figure 42) on détecte une bande qui pourrait correspondre à l'hétérodimère néanmoins si l'on observe le western-blot (Figure 42) l'hétérodimère n'est pas ou très peu détectable, donc cette espèce doit être sous représentée par rapport aux homodimères. C'est pour cela que je pense que la dimérisation n'est pas dépendante de la GST.

**(2) Test de dimérisation sur protéine entière**

Des expériences de même type ont été réalisées afin de savoir si les protéines entières pouvaient s'homodimériser. Dans ces expériences, j'ai donc recherché si les différentes protéines : GST-P85 $\alpha$  (G35), GST-P85 $\alpha$  $\Delta$ BH (G36) et GST-BH $\alpha$  (comme témoin de dimérisation) pouvaient former des homodimères.

Les protéines natives ont été déposées sur des gels d'acrylamide (8%) non dénaturants et de grande taille afin d'augmenter la résolution de séparation. Malgré plusieurs essais, je n'ai pas été en mesure de détecter les protéines GST-P85 $\alpha$  (G35), GST-P85 $\alpha$  $\Delta$ BH (G36), ces dernières semblaient bloquées au niveau de la transition gel de concentration-gel de séparation. (Résultats non présentés). Les protéines GST-P85 $\alpha$  (G35), GST-P85 $\alpha$  $\Delta$ BH (G36) ont un poids moléculaire important (respectivement 110 et 89 kda), il faudrait sûrement adapter la technique pour de tels poids moléculaire afin d'obtenir un résultat.

### **b) Spectrométrie de Masse**

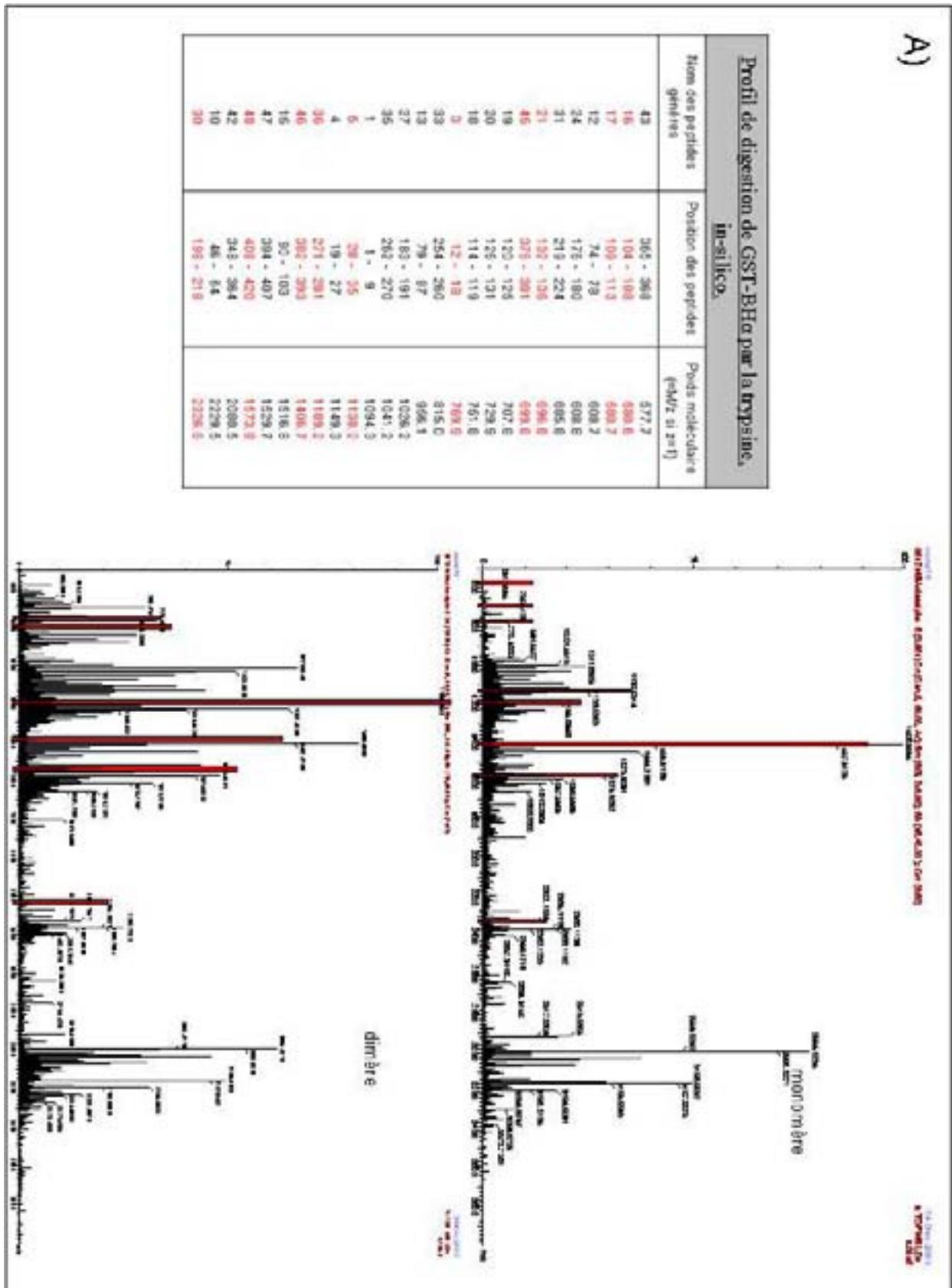
Pour confirmer l'identité des bandes détectées suite à la coloration au bleu de Coomassie et au western-blot, nous avons entrepris de réaliser une analyse par spectrométrie de masse.

J'ai réalisé ce travail en collaboration avec l'équipe de J.M. SCHMITTER (Laboratoire de Spectrométrie de Masse des Macromolécules Biologiques, IECB, Bordeaux, France). Pour faire ce travail, nous nous sommes placés dans les conditions similaires à celles utilisées pour faire les gels non dénaturants, avec davantage de matériel (50 µg de protéines). Les bandes supposées être les monomères et dimères (voir Figure 42) ont été découpées du gel et après digestion par la trypsine, les peptides générés ont été analysés par spectrométrie de masse.

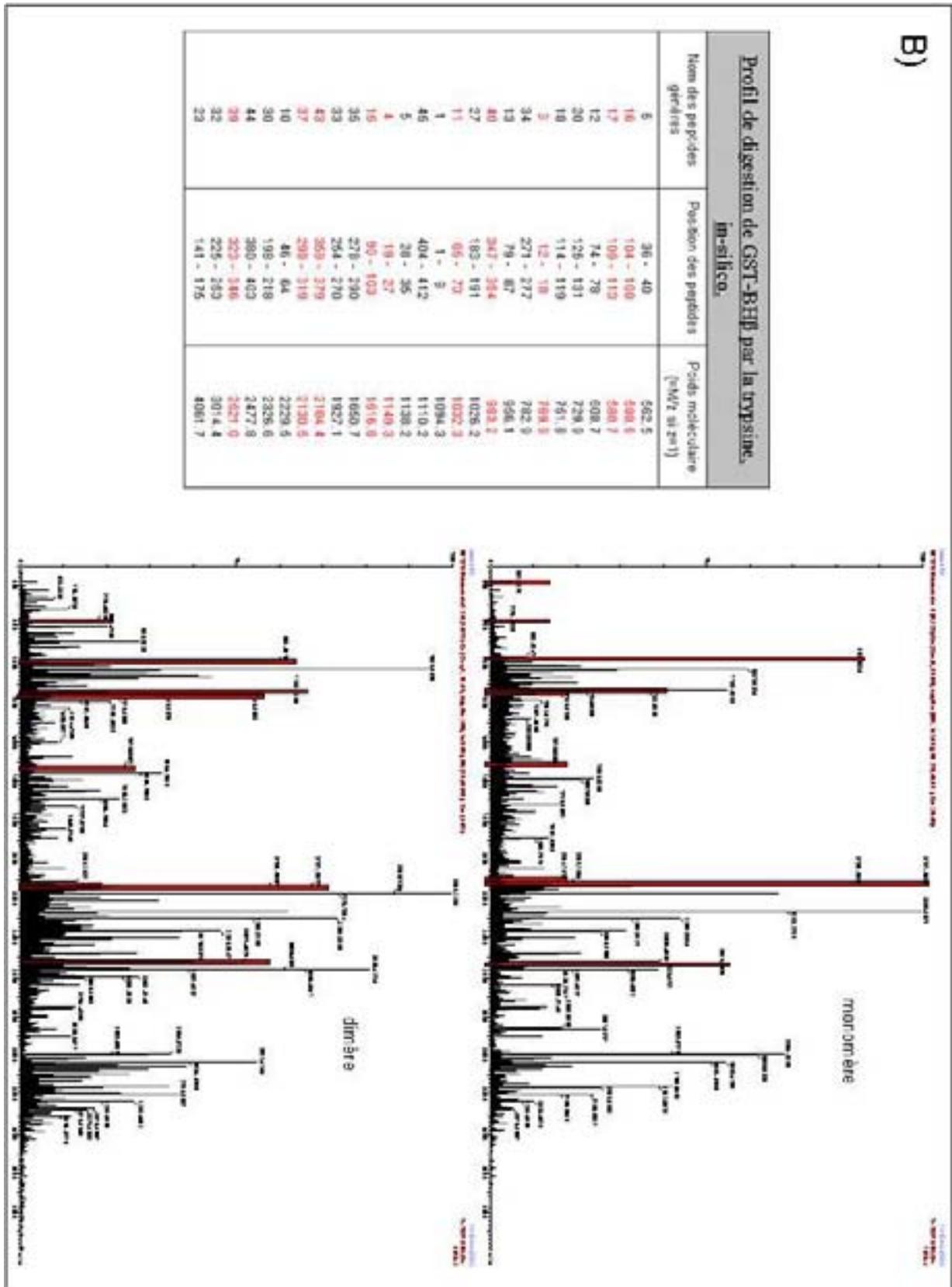
Les spectres obtenus après analyse ont été comparés à un profil théorique de peptides digéré par la trypsine. (Les profils de digestion théorique par la trypsine ont été obtenus à partir du programme : MS-Digest © Copyright (1997-2006) The Regents of the University of California). L'analyse des pics dans le spectre de masse correspondant au monomère présumé de GST-BH $\alpha$ , contient des spectres qui correspondent au profil théorique de digestion de la protéine GST-BH $\alpha$ . (voir Figure 44). Le spectre du dimère présumé (ou multimère) GST-BH $\alpha$  a été comparé à celui du monomère, ces deux spectres comportent des pics identiques ce qui signifie que ceux sont les mêmes protéines dans ces deux bandes c'est-à-dire de la protéine GST-BH $\alpha$ .

L'analyse des spectres pour GST-BH $\beta$  (voir Figure 45), nous a conduit à affirmer que le monomère correspond bien à la protéine GST-BH $\beta$  et surtout que le supposé dimère (ou multimère) correspond effectivement à la protéine GST-BH $\beta$ .

Par cette technique, nous n'avons pas pu analyser le probable hétérodimère GST-BH $\alpha$ -GST-BH $\beta$  ; la bande représentant «GST-BH $\alpha$ -GST-BH $\beta$ » n'était pas assez abondante pour envisager une analyse par spectrométrie de masse. L'autre point très critique, est que cette bande était cernée par les 2 homodimères, prélever cette bande aurait été risqué car j'aurais pu contaminer mon échantillon et donc fausser mon analyse.



**Figure 44 Le domaine BH $\alpha$  est capable de s'homodimériser.** Comparaison des spectres de masse obtenus à partir de l'espèce monomérique et de l'espèce dimérique. Le tableau représente un profil de digestion théorique par la trypsine.



**Figure 45** Le domaine BHβ est capable de s'homodimériser. Comparaison des spectres de masse obtenus à partir de l'espèce monomérique et de l'espèce dimérique. Le tableau représente un profil de digestion théorique par la trypsine.

**c) Conclusions sur l'étude de la dimérisation de P85**

Par ces approches de gels non dénaturants et par la suite par l'utilisation de la technique de spectrométrie de masse, j'ai pu mettre en évidence que les domaines BH isolés issus de P85 $\alpha$  et P85 $\beta$  pouvaient s'homodimériser. D'une part ceci m'a permis de montrer que les domaines isolés étaient fonctionnels puisque capables de s'homodimériser. Il reste à confirmer ces résultats sur protéines entières, les résultats n'étant pas convaincants dans les expériences préliminaires, il sera nécessaire d'adapter la technique pour des protéines de haut poids moléculaire.

L'étape suivante dans la recherche du rôle de ces homodimérisations sera de pouvoir mettre en évidence cette homodimérisation dans la cellule. Ceci pourra être résolu par l'utilisation de la technique de FRET ("Fluorescence Resonance Energy Transfer") par exemple. L'appréhension du rôle physiologique pourra être envisagée par l'utilisation des domaines BH isolés ; par leur surexpression dans la cellule, il devrait être possible de bloquer la formation des dimères de P85.



## **E. Conclusion Générale**

### **1. Caractérisation de la voie d'activation d'Akt par Rac**

Dans les deux premiers chapitres du manuscrit, j'ai décrit la caractérisation d'une nouvelle voie d'activation de la protéine Akt qui se fait en réponse à la surexpression d'une forme active de la GTPase Rac (L61Rac ou bien V12Rac). Montrée pour la première fois dans un modèle de cellules hématopoïétiques (cellules Jurkat), cette voie nommée « R-P-A » a été mise en évidence dans d'autres types cellulaires, qu'ils soient hématopoïétiques ou non. Nous avons fait l'observation que les cellules des différents types cellulaires capables d'activer cette voie avaient comme point commun de se trouver dans un état « Non Adhérent » ; seules les cellules dites Adhérentes étaient incapables d'activer la voie « R-P-A ». Nous avons par la suite pu établir que c'était le statut Adhérent qui était le facteur inhibiteur de cette voie. Afin de démontrer cela, nous avons utilisé deux types cellulaires, les cellules RBL-2H3 et les cellules A20, qui ont la particularité de se répartir spontanément en deux groupes : l'un Adhérent, l'autre Non Adhérent. Nous montrons que seules les cellules Non Adhérentes ont la capacité d'activer Akt suite à la surexpression de Rac activée (figure 5 de l'article et **Figure 25**). Pour appuyer ce résultat, nous avons également montré que dans des cellules endothéliales, les PAE, la voie « R-P-A » normalement réprimée peut-être activée dès lors que l'on cultive ces cellules dans un état Non Adhérent (voir figure 5 de l'article).

Au niveau moléculaire, l'étude de la voie « R-P-A » nous a permis de mettre en évidence un complexe comprenant la protéine Rac sous sa forme active ainsi que la protéine Akt. La formation de ce complexe est conditionnée par l'activation préalable d'Akt puisque l'utilisation d'un inhibiteur de la PI3K, le LY294002, entraîne le désassemblage du complexe.

Nous avons montré qu'en supplément de la perte du complexe Rac-Akt, l'utilisation de l'inhibiteur des PI3K bloque totalement l'activation d'Akt induite par Rac. Une régulation différentielle de la PI3K entre un état Adhérent et un état Non Adhérent pourrait être responsable de l'activation ou non de la voie en fonction de l'état d'adhérence. Nous nous sommes alors naturellement intéressés au rôle que pourraient exercer les régulateurs négatifs de l'activité de la PI3K que sont les phosphatases PTEN et SHIP. Comme supposé, la protéine PTEN exerce un rôle de modulateur de l'activation de la voie « R-P-A » en abaissant le niveau de PIP3 cellulaire. La protéine SHIP, comme PTEN, joue également un rôle de

## Conclusion générale

modulateur ; l'absence de SHIP permettant d'augmenter le niveau d'activation d'Akt induit par la surexpression de Rac (voir figure 6 de l'article). Nous avons mis en avant un autre rôle plus surprenant de SHIP : L'absence de la protéine SHIP permet de lever l'inhibition de la voie « R-P-A » exercée par l'état Adhérent. SHIP serait un inhibiteur de cette voie dans les cellules Adhérentes. Nous avons pu montrer que SHIP se trouve majoritairement membranaire dans les cellules Adhérentes et majoritairement cytosolique dans les cellules Non Adhérentes ; nous pensons donc que cette différence de localisation constitue l'élément régulant l'activation de la voie « R-P-A ». Nous aurions donc un système où les structures d'adhérence enrichies en intégrines recrutent la protéine SHIP probablement par l'intermédiaire de l'adaptateur P130<sup>cas</sup> et cette localisation membranaire de SHIP aurait alors, via un mécanisme encore inconnu, un effet inhibiteur sur l'activation de la voie « R-P-A ». Une cellule naturellement Non Adhérente ou devenue Non Adhérente verrait ses structures d'adhérence déstabilisées d'où la relocalisation cytosolique de SHIP qui n'exercerait plus son rôle inhibiteur sur la voie d'activation d'Akt par Rac. Pour démontrer cela, nous pourrions utiliser des mutants de SHIP incapables d'interagir avec P130<sup>cas</sup> ; ces mutants demeurant dans le cytosol devraient, selon notre hypothèse, ne plus exercer leur rôle inhibiteur et donc permettre l'activation d'Akt par Rac dans des cellules Adhérentes.

Une autre piste explorée pour comprendre le mécanisme permettant à Rac d'activer la protéine Akt a été d'étudier le rôle de la PI3K dans cette voie. L'activation d'Akt par Rac étant dépendante d'une activité PI3K, nous avons supposé que la GTPase agirait en amont de la PI3K pour l'activer et de ce fait entraînerait l'activation d'Akt. La PI3K de classe Ia est composée d'une sous-unité catalytique P110 et d'une sous-unité régulatrice P85. Parmi les différentes sous-unités P85, deux isoformes nous semblaient particulièrement intéressantes à étudier : P85 $\alpha$  et P85 $\beta$ . Ces isoformes portent toutes deux un domaine BH : domaine d'interaction putatif pour les GTPases Rac et Cdc42. Nous avons montré qu'il existe une interaction préférentielle de Rac avec le domaine BH de la protéine P85 $\alpha$ . Par ailleurs, des expériences préliminaires nous ont permis de montrer que Rac peut induire une phosphorylation de P85 $\alpha$  sur des résidus tyrosine ; de plus, dans la littérature, il est décrit que ces phosphorylations sont associées à une activation de la PI3K Ia (Cuevas, Lu et al. 2001). Nous pensons donc que Rac pourrait venir se fixer sur P85 $\alpha$  et moduler son état de phosphorylation pour activer la PI3K.

## Conclusion générale

Le rôle physiologique de cette voie reste à définir. L'activation de la protéine Akt par Rac pourrait être un mécanisme permettant de compenser une diminution temporaire de l'activation d'Akt. Les signaux permettant l'activation d'Akt proviennent essentiellement des structures d'adhérence ; lors d'un processus migratoire ces dernières sont déstabilisées, la voie « R-P-A » restaurerait l'activation d'Akt lui permettant d'accomplir ses fonctions cellulaires et d'assurer la survie cellulaire. Ceci pourrait être un mécanisme permettant aux lymphocytes qui oscillent, entre un état Adhérent (dans les tissus et la moelle osseuse) et un état Non Adhérent (dans le sang et la lymphe), de résister à l'apoptose lorsqu'ils se trouvent dans leur état Non Adhérent. En fournissant un signal anti-apoptotique, la voie « R-P-A » pourrait induire l'inhibition de l'anoïkis dans les cellules anormalement détachées de leur support et elle pourrait être alors l'une des causes du développement métastatique de certains cancers.

Pour approfondir l'étude de la voie d'activation d'Akt par Rac nous pourrions définir plusieurs objectifs :

- Il serait intéressant de pouvoir mettre en évidence cette voie sans recourir à la surexpression de Rac activée dans les cellules. Nous pourrions utiliser des inhibiteurs de Rac pour ensuite vérifier si l'activation d'Akt est affectée par cette inhibition.
- Il faudrait définir le rôle de cette voie : par exemple, permet-elle d'apporter un signal de survie ? Pour cela, nous pourrions induire l'apoptose en utilisant par exemple des toxines bactériennes telles que : « staphylococcal enterotoxin type B », « exotoxin A », la toxine cholérique,... on peut trouver d'autres toxines tels que « F16 » (calbiochem). Dans ces conditions et après avoir induit la voie « R-P-A », nous pourrions observer si cette voie conduit à une protection vis à vis de l'apoptose.
- Il nous faut par la suite répondre de la nécessité ou non de la formation du complexe Rac-Akt pour l'activation d'Akt ; la première hypothèse étant que Rac active Akt en se fixant sur cette dernière. La seconde hypothèse est la suivante : Rac étant un substrat d'Akt (Kwon, Kwon et al. 2000), il serait donc naturel de retrouver cette interaction augmentée suite à l'activation d'Akt par Rac ;

## Conclusion générale

l'interaction Rac-Akt ne serait pas une cause de l'activation d'Akt mais une conséquence. L'utilisation de mutants de Rac ou d'Akt devenus incapables de s'associer l'un avec l'autre pourrait nous permettre de défendre l'une des deux hypothèses. Si l'on peut montrer qu'un mutant de Rac ne pouvant plus se lier à Akt permet toujours son activation, nous pourrions dire que l'interaction n'est pas préalable à l'activation d'Akt.

- Pour expliquer l'activation d'Akt par Rac, nous proposons deux modèles. Celui où Rac interagit avec Akt pour l'activer, et l'autre où Rac activerait la PI3K permettant la synthèse de PIP3 qui vont ainsi permettre l'activation d'Akt. Nous avons certains arguments pour appuyer ce dernier modèle mais qui ne sont pas suffisants pour l'approuver : 1) Rac interagit avec la PI3K au travers de la sous-unité régulatrice P85. 2) J'ai pu montrer que Rac induisait une phosphorylation sur des résidus tyrosine de P85 ; phosphorylations décrites comme activatrice de la PI3K. Pour éprouver ce modèle, plusieurs axes d'études sont possibles :
  - *Premier Point* : Rac active t-il la PI3K ? Nous pourrions quantifier les niveaux de PIP3 par l'utilisation d'un anticorps reconnaissant les PIP3, nous comparerions ainsi les niveaux d'une cellule témoin versus une cellule surexprimant Rac actif dans laquelle la voie « R-P-A » est activée.
  - *Deuxième point* : Rac active t-il la PI3K de façon directe ou non ? Si Rac active la PI3K nous pensons que cette activation dépend du domaine BH porté par la protéine P85. Nous avons à notre disposition des domaines BH isolés que nous pourrions surexprimer afin de les utiliser comme compétiteurs de l'interaction Rac-P85. Dans l'hypothèse d'une activation directe de la PI3K par Rac, ces domaines BH devraient diminuer l'activation de la PI3K. D'une autre manière, nous pourrions éteindre l'expression d'une sous-unité P85 par ARN interférents et surexprimer une forme mutée de P85 où le domaine BH a été tronqué. Rac ne se fixerait plus à P85 et donc, selon notre hypothèse, nous devrions alors perdre l'activation de la PI3K et celle d'Akt.

## *Conclusion générale*

- *Troisième point* : Après avoir confirmé que Rac induit la phosphorylation de P85, nous pourrions créer un mutant de P85 qui ne pourrait plus être phosphorylé. En surexprimant ce mutant après avoir « éteint » la forme endogène, nous pourrions vérifier que Rac n'active plus la PI3K par perte des phosphorylations activatrices.

## **2. La PI3K régule la formation des podosomes**

Les chapitres 3 et 4 regroupent les travaux effectués sur une structure d'adhérence : les podosomes et en particulier les travaux sur le rôle de la PI3K dans la régulation de ces structures. Ces travaux nous ont permis de montrer que l'activité de la PI3K était indispensable à la formation des podosomes. La génération de ces structures étant induite par Cdc42, nous pensons que la PI3K pourrait être régulée directement par cette GTPase. Le lien entre Cdc42 et la PI3K serait une nouvelle fois le domaine BH de la sous-unité P85.

La régulation de la PI3K par Cdc42 reste à démontrer ; nous pourrions envisager l'étude de cette régulation en utilisant des approches similaires à celles décrites auparavant qui visaient à montrer que Rac pourrait activer la PI3K.

## *Conclusion générale*

Une vue d'ensemble de ces travaux nous permet de mettre en avant qu'il existe des liens étroits entre les GTPases et les PI3K. Ces protéines vont réguler des processus physiologiques identiques, de plus, ces protéines se régulent mutuellement : les GTPases activent la PI3K et inversement la PI3K active les GTPases. Dans un premier temps, la GTPase Ras a été montrée comme étant un activateur de la PI3K puis, dans un deuxième temps, les GTPases de la famille Rho : Rac et Cdc42 ont été montrés agissant en aval de la PI3K afin de moduler son activité.

Les travaux présentés dans ce manuscrit montrent que des voies induites par Rac et Cdc42 nécessitent une activité PI3K. Nous avons ainsi deux systèmes qui nous permettent d'étudier une régulation en amont de la PI3K exercée par une GTPase.

Par ce travail de thèse, nous avons posé les bases de l'étude de la régulation exercée par les Rho GTPases sur la PI3K et dans cette régulation nous mettons en avant que la sous-unité régulatrice P85 pourrait être l'élément essentiel. Le domaine BH serait alors le site par lequel les Rho GTPases Rac et Cdc42 réguleraient la PI3K.



***Bibliographie***

- Abercrombie, M. and G. A. Dunn (1975). "Adhesions of fibroblasts to substratum during contact inhibition observed by interference reflection microscopy." Exp Cell Res **92**(1): 57-62.
- Abercrombie, M., J. E. Heaysman and S. M. Pegrum (1971). "The locomotion of fibroblasts in culture. IV. Electron microscopy of the leading lamella." Exp Cell Res **67**(2): 359-67.
- Almeida, E. A., D. Ilic, Q. Han, C. R. Hauck, F. Jin, H. Kawakatsu, D. D. Schlaepfer and C. H. Damsky (2000). "Matrix survival signaling: from fibronectin via focal adhesion kinase to c-Jun NH(2)-terminal kinase." J Cell Biol **149**(3): 741-54.
- Altomare, D. A. and J. R. Testa (2005). "Perturbations of the AKT signaling pathway in human cancer." Oncogene **24**(50): 7455-64.
- Auger, K. R., L. A. Serunian, S. P. Soltoff, P. Libby and L. C. Cantley (1989). "PDGF-dependent tyrosine phosphorylation stimulates production of novel polyphosphoinositides in intact cells." Cell **57**(1): 167-75.
- Bachman, K. E., P. Argani, Y. Samuels, N. Silliman, J. Ptak, S. Szabo, H. Konishi, B. Karakas, B. G. Blair, C. Lin, B. A. Peters, V. E. Velculescu and B. H. Park (2004). "The PIK3CA gene is mutated with high frequency in human breast cancers." Cancer Biol Ther **3**(8): 772-5.
- Balendran, A., A. Casamayor, M. Deak, A. Paterson, P. Gaffney, R. Currie, C. P. Downes and D. R. Alessi (1999). "PDK1 acquires PDK2 activity in the presence of a synthetic peptide derived from the carboxyl terminus of PRK2." Curr Biol **9**(8): 393-404.
- Barroso, I., J. Luan, R. P. Middelberg, A. H. Harding, P. W. Franks, R. W. Jakes, D. Clayton, A. J. Schafer, S. O'Rahilly and N. J. Wareham (2003). "Candidate gene association study in type 2 diabetes indicates a role for genes involved in beta-cell function as well as insulin action." PLoS Biol **1**(1): E20.
- Beeton, C. A., E. M. Chance, L. C. Foukas and P. R. Shepherd (2000). "Comparison of the kinetic properties of the lipid- and protein-kinase activities of the p110alpha and p110beta catalytic subunits of class-Ia phosphoinositide 3-kinases." Biochem J **350 Pt 2**: 353-9.
- Bershadsky, A. D., C. Ballestrem, L. Carramusa, Y. Zilberman, B. Gilquin, S. Khochbin, A. Y. Alexandrova, A. B. Verkhovskiy, T. Shemesh and M. M. Kozlov (2006). "Assembly and mechanosensory function of focal adhesions: experiments and models." Eur J Cell Biol **85**(3-4): 165-73.
- Bishop, A. L. and A. Hall (2000). "Rho GTPases and their effector proteins." Biochem J **348 Pt 2**: 241-55.
- Bokoch, G. M., C. J. Vlahos, Y. Wang, U. G. Knaus and A. E. Traynor-Kaplan (1996). "Rac GTPase interacts specifically with phosphatidylinositol 3-kinase." Biochem J **315 (Pt 3)**: 775-9.
- Borlado, L. R., C. Redondo, B. Alvarez, C. Jimenez, L. M. Criado, J. Flores, M. A. Marcos, A. C. Martinez, D. Balomenos and A. C. Carrera (2000). "Increased phosphoinositide 3-kinase activity induces a lymphoproliferative disorder and contributes to tumor generation in vivo." Faseb J **14**(7): 895-903.
- Brachmann, S. M., K. Ueki, J. A. Engelman, R. C. Kahn and L. C. Cantley (2005). "Phosphoinositide 3-kinase catalytic subunit deletion and regulatory subunit deletion have opposite effects on insulin sensitivity in mice." Mol Cell Biol **25**(5): 1596-607.

## **Bibliographie**

- Brachmann, S. M., C. M. Yballe, M. Innocenti, J. A. Deane, D. A. Fruman, S. M. Thomas and L. C. Cantley (2005). "Role of phosphoinositide 3-kinase regulatory isoforms in development and actin rearrangement." *Mol Cell Biol* **25**(7): 2593-606.
- Broderick, D. K., C. Di, T. J. Parrett, Y. R. Samuels, J. M. Cummins, R. E. McLendon, D. W. Fults, V. E. Velculescu, D. D. Bigner and H. Yan (2004). "Mutations of PIK3CA in anaplastic oligodendrogliomas, high-grade astrocytomas, and medulloblastomas." *Cancer Res* **64**(15): 5048-50.
- Campbell, I. G., S. E. Russell, D. Y. Choong, K. G. Montgomery, M. L. Ciavarella, C. S. Hooi, B. E. Cristiano, R. B. Pearson and W. A. Phillips (2004). "Mutation of the PIK3CA gene in ovarian and breast cancer." *Cancer Res* **64**(21): 7678-81.
- Camps, M., T. Ruckle, H. Ji, V. Ardisson, F. Rintelen, J. Shaw, C. Ferrandi, C. Chabert, C. Gillieron, B. Francon, T. Martin, D. Gretener, D. Perrin, D. Leroy, P. A. Vitte, E. Hirsch, M. P. Wymann, R. Cirillo, M. K. Schwarz and C. Rommel (2005). "Blockade of PI3Kgamma suppresses joint inflammation and damage in mouse models of rheumatoid arthritis." *Nat Med* **11**(9): 936-43.
- Cantley, L. C. and B. G. Neel (1999). "New insights into tumor suppression: PTEN suppresses tumor formation by restraining the phosphoinositide 3-kinase/AKT pathway." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(8): 4240-5.
- Cardone, M. H., N. Roy, H. R. Stennicke, G. S. Salvesen, T. F. Franke, E. Stanbridge, S. Frisch and J. C. Reed (1998). "Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation." *Science* **282**(5392): 1318-21.
- Chamberlain, M. D., T. R. Berry, M. C. Pastor and D. H. Anderson (2004). "The p85alpha subunit of phosphatidylinositol 3'-kinase binds to and stimulates the GTPase activity of Rab proteins." *J Biol Chem* **279**(47): 48607-14.
- Chellaiah, M. and K. Hruska (1996). "Osteopontin stimulates gelsolin-associated phosphoinositide levels and phosphatidylinositol triphosphate-hydroxyl kinase." *Mol Biol Cell* **7**(5): 743-53.
- Chellaiah, M. A., R. S. Biswas, D. Yuen, U. M. Alvarez and K. A. Hruska (2001). "Phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate directs association of Src homology 2-containing signaling proteins with gelsolin." *J Biol Chem* **276**(50): 47434-44.
- Chen, H. C. and J. L. Guan (1994). "Association of focal adhesion kinase with its potential substrate phosphatidylinositol 3-kinase." *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(21): 10148-52.
- Cheng, J. Q., A. K. Godwin, A. Bellacosa, T. Taguchi, T. F. Franke, T. C. Hamilton, P. N. Tsichlis and J. R. Testa (1992). "AKT2, a putative oncogene encoding a member of a subfamily of protein-serine/threonine kinases, is amplified in human ovarian carcinomas." *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**(19): 9267-71.
- Condliffe, A. M., K. Davidson, K. E. Anderson, C. D. Ellson, T. Crabbe, K. Okkenhaug, B. Vanhaesebroeck, M. Turner, L. Webb, M. P. Wymann, E. Hirsch, T. Ruckle, M. Camps, C. Rommel, S. P. Jackson, E. R. Chilvers, L. R. Stephens and P. T. Hawkins (2005). "Sequential activation of class IB and class IA PI3K is important for the primed respiratory burst of human but not murine neutrophils." *Blood* **106**(4): 1432-40.
- Coniglio, S. J., T. S. Jou and M. Symons (2001). "Rac1 protects epithelial cells against anoikis." *J Biol Chem* **276**(30): 28113-20.
- Cordes, N., J. Seidler, R. Durzok, H. Geinitz and C. Brakebusch (2006). "beta1-integrin-mediated signaling essentially contributes to cell survival after radiation-induced genotoxic injury." *Oncogene* **25**(9): 1378-90.
- Coucouvani, E. and G. R. Martin (1995). "Signals for death and survival: a two-step mechanism for cavitation in the vertebrate embryo." *Cell* **83**(2): 279-87.

## **Bibliographie**

- Cuevas, B. D., Y. Lu, M. Mao, J. Zhang, R. LaPushin, K. Siminovitch and G. B. Mills (2001). "Tyrosine phosphorylation of p85 relieves its inhibitory activity on phosphatidylinositol 3-kinase." *J Biol Chem* **276**(29): 27455-61.
- David-Pfeuty, T. and S. J. Singer (1980). "Altered distributions of the cytoskeletal proteins vinculin and alpha-actinin in cultured fibroblasts transformed by Rous sarcoma virus." *Proc Natl Acad Sci U S A* **77**(11): 6687-91.
- Davis, W., L. R. Stephens, P. T. Hawkins and J. Saklatvala (1999). "Synergistic activation of JNK/SAPK by interleukin-1 and platelet-derived growth factor is independent of Rac and Cdc42." *Biochem J* **338** (Pt 2): 387-92.
- del Pozo, M. A., N. B. Alderson, W. B. Kiosses, H. H. Chiang, R. G. Anderson and M. A. Schwartz (2004). "Integrins regulate Rac targeting by internalization of membrane domains." *Science* **303**(5659): 839-42.
- Del Pozo, M. A., W. B. Kiosses, N. B. Alderson, N. Meller, K. M. Hahn and M. A. Schwartz (2002). "Integrins regulate GTP-Rac localized effector interactions through dissociation of Rho-GDI." *Nat Cell Biol* **4**(3): 232-9.
- Donald, S., K. Hill, C. Lecureuil, R. Barnouin, S. Krugmann, W. John Coadwell, S. R. Andrews, S. A. Walker, P. T. Hawkins, L. R. Stephens and H. C. Welch (2004). "P-Rex2, a new guanine-nucleotide exchange factor for Rac." *FEBS Lett* **572**(1-3): 172-6.
- Etienne-Manneville, S. and A. Hall (2002). "Rho GTPases in cell biology." *Nature* **420**(6916): 629-35.
- Fayard, E., L. A. Tintignac, A. Baudry and B. A. Hemmings (2005). "Protein kinase B/Akt at a glance." *J Cell Sci* **118**(Pt 24): 5675-8.
- Feng, J., J. Park, P. Cron, D. Hess and B. A. Hemmings (2004). "Identification of a PKB/Akt hydrophobic motif Ser-473 kinase as DNA-dependent protein kinase." *J Biol Chem* **279**(39): 41189-96.
- Filippa, N., C. L. Sable, C. Filloux, B. Hemmings and E. Van Obberghen (1999). "Mechanism of protein kinase B activation by cyclic AMP-dependent protein kinase." *Mol Cell Biol* **19**(7): 4989-5000.
- Franke, T. F., S. I. Yang, T. O. Chan, K. Datta, A. Kazlauskas, D. K. Morrison, D. R. Kaplan and P. N. Tsichlis (1995). "The protein kinase encoded by the Akt proto-oncogene is a target of the PDGF-activated phosphatidylinositol 3-kinase." *Cell* **81**(5): 727-36.
- Frisch, S. M. and E. Ruoslahti (1997). "Integrins and anoikis." *Curr Opin Cell Biol* **9**(5): 701-6.
- Frisch, S. M. and R. A. Screaton (2001). "Anoikis mechanisms." *Curr Opin Cell Biol* **13**(5): 555-62.
- Fruman, D. A., S. B. Snapper, C. M. Yballe, L. Davidson, J. Y. Yu, F. W. Alt and L. C. Cantley (1999). "Impaired B cell development and proliferation in absence of phosphoinositide 3-kinase p85alpha." *Science* **283**(5400): 393-7.
- Fukui, Y., S. Kornbluth, S. M. Jong, L. H. Wang and H. Hanafusa (1989). "Phosphatidylinositol kinase type I activity associates with various oncogene products." *Oncogene Res* **4**(4): 283-92.
- Gelkop, S., Y. Babichev and N. Isakov (2001). "T cell activation induces direct binding of the Crk adapter protein to the regulatory subunit of phosphatidylinositol 3-kinase (p85) via a complex mechanism involving the Cbl protein." *J Biol Chem* **276**(39): 36174-82.
- Genot, E. M., C. Arriemerlou, G. Ku, B. M. Burgering, A. Weiss and I. M. Kramer (2000). "The T-cell receptor regulates Akt (protein kinase B) via a pathway involving Rac1 and phosphatidylinositide 3-kinase." *Mol Cell Biol* **20**(15): 5469-78.
- Giancotti, F. G. and E. Ruoslahti (1999). "Integrin signaling." *Science* **285**(5430): 1028-32.

## **Bibliographie**

- Gniadecki, R., G. B. Jemec, B. M. Thomsen and M. Hansen (1998). "Relationship between keratinocyte adhesion and death: anoikis in acantholytic diseases." Arch Dermatol Res **290**(10): 528-32.
- Gout, I., G. Middleton, J. Adu, N. N. Ninkina, L. B. Drobot, V. Filonenko, G. Matsuka, A. M. Davies, M. Waterfield and V. L. Buchman (2000). "Negative regulation of PI 3-kinase by Ruk, a novel adaptor protein." Embo J **19**(15): 4015-25.
- Greer, E. L. and A. Brunet (2005). "FOXO transcription factors at the interface between longevity and tumor suppression." Oncogene **24**(50): 7410-25.
- Hall, A. (2005). "Rho GTPases and the control of cell behaviour." Biochem Soc Trans **33**(Pt 5): 891-5.
- Hansen, T., C. B. Andersen, S. M. Echwald, S. A. Urhammer, J. O. Clausen, H. Vestergaard, D. Owens, L. Hansen and O. Pedersen (1997). "Identification of a common amino acid polymorphism in the p85alpha regulatory subunit of phosphatidylinositol 3-kinase: effects on glucose disappearance constant, glucose effectiveness, and the insulin sensitivity index." Diabetes **46**(3): 494-501.
- Harpur, A. G., M. J. Layton, P. Das, M. J. Bottomley, G. Panayotou, P. C. Driscoll and M. D. Waterfield (1999). "Intermolecular interactions of the p85alpha regulatory subunit of phosphatidylinositol 3-kinase." J Biol Chem **274**(18): 12323-32.
- Harrison-Findik, D., S. Misra, S. K. Jain, M. L. Keeler, K. A. Powell, C. S. Malladi, L. Varticovski and P. J. Robinson (2001). "Dynamain inhibits phosphatidylinositol 3-kinase in hematopoietic cells." Biochim Biophys Acta **1538**(1): 10-9.
- Hartley, D., H. Meisner and S. Corvera (1995). "Specific association of the beta isoform of the p85 subunit of phosphatidylinositol-3 kinase with the proto-oncogene c-cbl." J Biol Chem **270**(31): 18260-3.
- Hawkins, P. T., A. Eguinoa, R. G. Qiu, D. Stokoe, F. T. Cooke, R. Walters, S. Wennstrom, L. Claesson-Welsh, T. Evans, M. Symons and et al. (1995). "PDGF stimulates an increase in GTP-Rac via activation of phosphoinositide 3-kinase." Curr Biol **5**(4): 393-403.
- Hill, K. M., Y. Huang, S. C. Yip, J. Yu, J. E. Segall and J. M. Backer (2001). "N-terminal domains of the class Ia phosphoinositide 3-kinase regulatory subunit play a role in cytoskeletal but not mitogenic signaling." J Biol Chem **276**(19): 16374-8.
- Hungerford, J. E., M. T. Compton, M. L. Matter, B. G. Hoffstrom and C. A. Otey (1996). "Inhibition of pp125FAK in cultured fibroblasts results in apoptosis." J Cell Biol **135**(5): 1383-90.
- Inabe, K., M. Ishiai, A. M. Scharenberg, N. Freshney, J. Downward and T. Kurosaki (2002). "Vav3 modulates B cell receptor responses by regulating phosphoinositide 3-kinase activation." J Exp Med **195**(2): 189-200.
- Izzard, C. S. and L. R. Lochner (1976). "Cell-to-substrate contacts in living fibroblasts: an interference reflexion study with an evaluation of the technique." J Cell Sci **21**(1): 129-59.
- Izzard, C. S. and L. R. Lochner (1980). "Formation of cell-to-substrate contacts during fibroblast motility: an interference-reflexion study." J Cell Sci **42**: 81-116.
- Jacinto, E., V. Facchinetti, D. Liu, N. Soto, S. Wei, S. Y. Jung, Q. Huang, J. Qin and B. Su (2006). "SIN1/MIP1 Maintains rictor-mTOR Complex Integrity and Regulates Akt Phosphorylation and Substrate Specificity." Cell **127**(1): 125-37.
- Jackson, S. P., S. M. Schoenwaelder, I. Goncalves, W. S. Nesbitt, C. L. Yap, C. E. Wright, V. Kenche, K. E. Anderson, S. M. Dopheide, Y. Yuan, S. A. Sturgeon, H. Prabakaran, P. E. Thompson, G. D. Smith, P. R. Shepherd, N. Daniele, S. Kulkarni, B. Abbott, D. Saylik, C. Jones, L. Lu, S. Giuliano, S. C. Hughan, J. A. Angus, A. D. Robertson and

## **Bibliographie**

- H. H. Salem (2005). "PI 3-kinase p110beta: a new target for antithrombotic therapy." *Nat Med* **11**(5): 507-14.
- Jaffe, A. B. and A. Hall (2005). "Rho GTPases: biochemistry and biology." *Annu Rev Cell Dev Biol* **21**: 247-69.
- Jahn, T., P. Seipel, S. Urschel, C. Peschel and J. Duyster (2002). "Role for the adaptor protein Grb10 in the activation of Akt." *Mol Cell Biol* **22**(4): 979-91.
- Janssen, J. W., L. Schleithoff, C. R. Bartram and A. S. Schulz (1998). "An oncogenic fusion product of the phosphatidylinositol 3-kinase p85beta subunit and HUMORF8, a putative deubiquitinating enzyme." *Oncogene* **16**(13): 1767-72.
- Jimenez, C., D. R. Jones, P. Rodriguez-Viciano, A. Gonzalez-Garcia, E. Leonardo, S. Wennstrom, C. von Kobbe, J. L. Toran, R. B. L. V. Calvo, S. G. Copin, J. P. Albar, M. L. Gaspar, E. Diez, M. A. Marcos, J. Downward, A. C. Martinez, I. Merida and A. C. Carrera (1998). "Identification and characterization of a new oncogene derived from the regulatory subunit of phosphoinositide 3-kinase." *Embo J* **17**(3): 743-53.
- Jimenez, C., R. A. Portela, M. Mellado, J. M. Rodriguez-Frade, J. Collard, A. Serrano, A. C. Martinez, J. Avila and A. C. Carrera (2000). "Role of the PI3K regulatory subunit in the control of actin organization and cell migration." *J Cell Biol* **151**(2): 249-62.
- Jucker, M., K. Sudel, S. Horn, M. Sickel, W. Wegner, W. Fiedler and R. A. Feldman (2002). "Expression of a mutated form of the p85alpha regulatory subunit of phosphatidylinositol 3-kinase in a Hodgkin's lymphoma-derived cell line (CO)." *Leukemia* **16**(5): 894-901.
- Kanaho, Y. and T. Suzuki (2002). "Phosphoinositide kinases as enzymes that produce versatile signaling lipids, phosphoinositides." *J Biochem (Tokyo)* **131**(4): 503-9.
- Kang, H., H. Schneider and C. E. Rudd (2002). "Phosphatidylinositol 3-kinase p85 adaptor function in T-cells. Co-stimulation and regulation of cytokine transcription independent of associated p110." *J Biol Chem* **277**(2): 912-21.
- Kaplan, D. R., M. Whitman, B. Schaffhausen, D. C. Pallas, M. White, L. Cantley and T. M. Roberts (1987). "Common elements in growth factor stimulation and oncogenic transformation: 85 kd phosphoprotein and phosphatidylinositol kinase activity." *Cell* **50**(7): 1021-9.
- Katsumi, A., J. Milanini, W. B. Kiosses, M. A. del Pozo, R. Kaunas, S. Chien, K. M. Hahn and M. A. Schwartz (2002). "Effects of cell tension on the small GTPase Rac." *J Cell Biol* **158**(1): 153-64.
- Kawakami, Y., H. Nishimoto, J. Kitaura, M. Maeda-Yamamoto, R. M. Kato, D. R. Littman, M. Leitges, D. J. Rawlings and T. Kawakami (2004). "Protein kinase C betaII regulates Akt phosphorylation on Ser-473 in a cell type- and stimulus-specific fashion." *J Biol Chem* **279**(46): 47720-5.
- Keely, P. J., J. K. Westwick, I. P. Whitehead, C. J. Der and L. V. Parise (1997). "Cdc42 and Rac1 induce integrin-mediated cell motility and invasiveness through PI(3)K." *Nature* **390**(6660): 632-6.
- Khwaja, A., P. Rodriguez-Viciano, S. Wennstrom, P. H. Warne and J. Downward (1997). "Matrix adhesion and Ras transformation both activate a phosphoinositide 3-OH kinase and protein kinase B/Akt cellular survival pathway." *Embo J* **16**(10): 2783-93.
- Kirsch, K. H., M. M. Georgescu, S. Ishimaru and H. Hanafusa (1999). "CMS: an adapter molecule involved in cytoskeletal rearrangements." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(11): 6211-6.
- Knight, Z. A., B. Gonzalez, M. E. Feldman, E. R. Zunder, D. D. Goldenberg, O. Williams, R. Loewith, D. Stokoe, A. Balla, B. Toth, T. Balla, W. A. Weiss, R. L. Williams and K. M. Shokat (2006). "A pharmacological map of the PI3-K family defines a role for p110alpha in insulin signaling." *Cell* **125**(4): 733-47.

## **Bibliographie**

- Kohn, W. D., C. T. Mant and R. S. Hodges (1997). "Alpha-helical protein assembly motifs." J Biol Chem **272**(5): 2583-6.
- Kozma, R., S. Ahmed, A. Best and L. Lim (1996). "The GTPase-activating protein n-chimaerin cooperates with Rac1 and Cdc42Hs to induce the formation of lamellipodia and filopodia." Mol Cell Biol **16**(9): 5069-80.
- Kwon, T., D. Y. Kwon, J. Chun, J. H. Kim and S. S. Kang (2000). "Akt protein kinase inhibits Rac1-GTP binding through phosphorylation at serine 71 of Rac1." J Biol Chem **275**(1): 423-8.
- Laine, J., G. Kunstle, T. Obata and M. Noguchi (2002). "Differential regulation of Akt kinase isoforms by the members of the TCL1 oncogene family." J Biol Chem **277**(5): 3743-51.
- Laine, J., G. Kunstle, T. Obata, M. Sha and M. Noguchi (2000). "The protooncogene TCL1 is an Akt kinase coactivator." Mol Cell **6**(2): 395-407.
- Lakkakorpi, P. T., G. Wesolowski, Z. Zimolo, G. A. Rodan and S. B. Rodan (1997). "Phosphatidylinositol 3-kinase association with the osteoclast cytoskeleton, and its involvement in osteoclast attachment and spreading." Exp Cell Res **237**(2): 296-306.
- Lemmon, M. A. and K. M. Ferguson (2000). "Signal-dependent membrane targeting by pleckstrin homology (PH) domains." Biochem J **350 Pt 1**: 1-18.
- Ley, K. (2001). "Functions of selectins." Results Probl Cell Differ **33**: 177-200.
- Li, E., D. G. Stupack, S. L. Brown, R. Klemke, D. D. Schlaepfer and G. R. Nemerow (2000). "Association of p130CAS with phosphatidylinositol-3-OH kinase mediates adenovirus cell entry." J Biol Chem **275**(19): 14729-35.
- Li, M., X. Liu, G. Robinson, U. Bar-Peled, K. U. Wagner, W. S. Young, L. Hennighausen and P. A. Furth (1997). "Mammary-derived signals activate programmed cell death during the first stage of mammary gland involution." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(7): 3425-30.
- Luo, J. and L. C. Cantley (2005). "The negative regulation of phosphoinositide 3-kinase signaling by p85 and its implication in cancer." Cell Cycle **4**(10): 1309-12.
- Luo, J., J. R. McMullen, C. L. Sobkiw, L. Zhang, A. L. Dorfman, M. C. Sherwood, M. N. Logsdon, J. W. Horner, R. A. DePinho, S. Izumo and L. C. Cantley (2005). "Class IA phosphoinositide 3-kinase regulates heart size and physiological cardiac hypertrophy." Mol Cell Biol **25**(21): 9491-502.
- Maira, S. M., I. Galetic, D. P. Brazil, S. Kaech, E. Ingley, M. Thelen and B. A. Hemmings (2001). "Carboxyl-terminal modulator protein (CTMP), a negative regulator of PKB/Akt and v-Akt at the plasma membrane." Science **294**(5541): 374-80.
- Manohar, A., S. G. Shome, J. Lamar, L. Stirling, V. Iyer, K. Pumiglia and C. M. DiPersio (2004). "Alpha 3 beta 1 integrin promotes keratinocyte cell survival through activation of a MEK/ERK signaling pathway." J Cell Sci **117**(Pt 18): 4043-54.
- Marchisio, P. C., D. Cirillo, L. Naldini, M. V. Primavera, A. Teti and A. Zamboni-Zallone (1984). "Cell-substratum interaction of cultured avian osteoclasts is mediated by specific adhesion structures." J Cell Biol **99**(5): 1696-705.
- Martinez-Lorenzo, M. J., A. Anel, I. Monleon, J. J. Sierra, A. Pineiro, J. Naval and M. A. Alava (2000). "Tyrosine phosphorylation of the p85 subunit of phosphatidylinositol 3-kinase correlates with high proliferation rates in sublines derived from the Jurkat leukemia." Int J Biochem Cell Biol **32**(4): 435-45.
- Missy, K., V. Van Poucke, P. Raynal, C. Viala, G. Mauco, M. Plantavid, H. Chap and B. Payrastra (1998). "Lipid products of phosphoinositide 3-kinase interact with Rac1 GTPase and stimulate GDP dissociation." J Biol Chem **273**(46): 30279-86.
- Moon, S. Y. and Y. Zheng (2003). "Rho GTPase-activating proteins in cell regulation." Trends Cell Biol **13**(1): 13-22.

## Bibliographie

- Moreau, V., F. Tatin, C. Varon, G. Anies, C. Savona-Baron and E. Genot (2006). "Cdc42-driven podosome formation in endothelial cells." *Eur J Cell Biol* **85**(3-4): 319-25.
- Moreau, V., F. Tatin, C. Varon and E. Genot (2003). "Actin can reorganize into podosomes in aortic endothelial cells, a process controlled by Cdc42 and RhoA." *Mol Cell Biol* **23**(19): 6809-22.
- Morley, S., J. Wagner, K. Kauppinen, M. Sherman and D. Manor (2006). "Requirement for Akt-mediated survival in cell transformation by the *dbl* oncogene." *Cell Signal*.
- Musacchio, A., L. C. Cantley and S. C. Harrison (1996). "Crystal structure of the breakpoint cluster region-homology domain from phosphoinositide 3-kinase p85 alpha subunit." *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(25): 14373-8.
- Nikiforov, M. A., S. S. Kwek, R. Mehta, J. E. Artwohl, S. W. Lowe, T. D. Gupta, G. I. Deichman and A. V. Gudkov (1997). "Suppression of apoptosis by *bcl-2* does not prevent p53-mediated control of experimental metastasis and anchorage dependence." *Oncogene* **15**(25): 3007-12.
- Nobes, C. D. and A. Hall (1995). "Rho, rac, and cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia." *Cell* **81**(1): 53-62.
- Okamoto, T., K. Namikawa, T. Asano, K. Takaoka and H. Kiyama (2004). "Differential regulation of the regulatory subunits for phosphatidylinositol 3-kinase in response to motor nerve injury." *Brain Res Mol Brain Res* **131**(1-2): 119-25.
- Okkenhaug, K. and B. Vanhaesebroeck (2001). "New responsibilities for the PI3K regulatory subunit p85 alpha." *Sci STKE* **2001**(65): PE1.
- Onofri, F., S. Giovedi, H. T. Kao, F. Valtorta, L. Bongiorno Borbone, P. De Camilli, P. Greengard and F. Benfenati (2000). "Specificity of the binding of synapsin I to Src homology 3 domains." *J Biol Chem* **275**(38): 29857-67.
- Otsu, M., I. Hiles, I. Gout, M. J. Fry, F. Ruiz-Larrea, G. Panayotou, A. Thompson, R. Dhand, J. Hsuan, N. Totty and et al. (1991). "Characterization of two 85 kd proteins that associate with receptor tyrosine kinases, middle-T/pp60c-src complexes, and PI3-kinase." *Cell* **65**(1): 91-104.
- Oudit, G. Y., H. Sun, B. G. Kerfant, M. A. Crackower, J. M. Penninger and P. H. Backx (2004). "The role of phosphoinositide-3 kinase and PTEN in cardiovascular physiology and disease." *J Mol Cell Cardiol* **37**(2): 449-71.
- Parsons, R. (2004). "Human cancer, PTEN and the PI-3 kinase pathway." *Semin Cell Dev Biol* **15**(2): 171-6.
- Patel, S. D., C. P. Chen, F. Bahna, B. Honig and L. Shapiro (2003). "Cadherin-mediated cell-cell adhesion: sticking together as a family." *Curr Opin Struct Biol* **13**(6): 690-8.
- Pleiman, C. M., W. M. Hertz and J. C. Cambier (1994). "Activation of phosphatidylinositol-3' kinase by Src-family kinase SH3 binding to the p85 subunit." *Science* **263**(5153): 1609-12.
- Puthalakath, H., A. Villunger, L. A. O'Reilly, J. G. Beaumont, L. Coultas, R. E. Cheney, D. C. Huang and A. Strasser (2001). "Bmf: a proapoptotic BH3-only protein regulated by interaction with the myosin V actin motor complex, activated by anoikis." *Science* **293**(5536): 1829-32.
- Reif, K., I. Gout, M. D. Waterfield and D. A. Cantrell (1993). "Divergent regulation of phosphatidylinositol 3-kinase P85 alpha and P85 beta isoforms upon T cell activation." *J Biol Chem* **268**(15): 10780-8.
- Ren, S. Y., E. Bolton, M. G. Mohi, A. Morrione, B. G. Neel and T. Skorski (2005). "Phosphatidylinositol 3-kinase p85 {alpha} subunit-dependent interaction with BCR/ABL-related fusion tyrosine kinases: molecular mechanisms and biological consequences." *Mol Cell Biol* **25**(18): 8001-8.

## **Bibliographie**

- Ren, S. Y., F. Xue, J. Feng and T. Skorski (2005). "Intrinsic regulation of the interactions between the SH3 domain of p85 subunit of phosphatidylinositol-3 kinase and the protein network of BCR/ABL oncogenic tyrosine kinase." Exp Hematol **33**(10): 1222-8.
- Ren, X. D., W. B. Kiosses and M. A. Schwartz (1999). "Regulation of the small GTP-binding protein Rho by cell adhesion and the cytoskeleton." Embo J **18**(3): 578-85.
- Ridley, A. J. and A. Hall (1992). "The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors." Cell **70**(3): 389-99.
- Ridley, A. J., H. F. Paterson, C. L. Johnston, D. Diekmann and A. Hall (1992). "The small GTP-binding protein rac regulates growth factor-induced membrane ruffling." Cell **70**(3): 401-10.
- Riveline, D., E. Zamir, N. Q. Balaban, U. S. Schwarz, T. Ishizaki, S. Narumiya, Z. Kam, B. Geiger and A. D. Bershadsky (2001). "Focal contacts as mechanosensors: externally applied local mechanical force induces growth of focal contacts by an mDia1-dependent and ROCK-independent mechanism." J Cell Biol **153**(6): 1175-86.
- Rodriguez-Viciana, P., B. M. Marte, P. H. Warne and J. Downward (1996). "Phosphatidylinositol 3' kinase: one of the effectors of Ras." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **351**(1336): 225-31; discussion 231-2.
- Rottner, K., A. Hall and J. V. Small (1999). "Interplay between Rac and Rho in the control of substrate contact dynamics." Curr Biol **9**(12): 640-8.
- Ruoslahti, E. and J. C. Reed (1994). "Anchorage dependence, integrins, and apoptosis." Cell **77**(4): 477-8.
- Sadhu, C., B. Masinovsky, K. Dick, C. G. Sowell and D. E. Staunton (2003). "Essential role of phosphoinositide 3-kinase delta in neutrophil directional movement." J Immunol **170**(5): 2647-54.
- Samuels, Y. and K. Ericson (2006). "Oncogenic PI3K and its role in cancer." Curr Opin Oncol **18**(1): 77-82.
- Samuels, Y., Z. Wang, A. Bardelli, N. Silliman, J. Ptak, S. Szabo, H. Yan, A. Gazdar, S. M. Powell, G. J. Riggins, J. K. Willson, S. Markowitz, K. W. Kinzler, B. Vogelstein and V. E. Velculescu (2004). "High frequency of mutations of the PIK3CA gene in human cancers." Science **304**(5670): 554.
- Sanjay, A., W. C. Horne and R. Baron (2001). "The Cbl family: ubiquitin ligases regulating signaling by tyrosine kinases." Sci STKE **2001**(110): PE40.
- Sarbassov, D. D., S. M. Ali, S. Sengupta, J. H. Sheen, P. P. Hsu, A. F. Bagley, A. L. Markhard and D. M. Sabatini (2006). "Prolonged rapamycin treatment inhibits mTORC2 assembly and Akt/PKB." Mol Cell **22**(2): 159-68.
- Sarbassov, D. D., D. A. Guertin, S. M. Ali and D. M. Sabatini (2005). "Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex." Science **307**(5712): 1098-101.
- Schlaepfer, D. D. and T. Hunter (1997). "Focal adhesion kinase overexpression enhances ras-dependent integrin signaling to ERK2/mitogen-activated protein kinase through interactions with and activation of c-Src." J Biol Chem **272**(20): 13189-95.
- Schwartz, M. (2004). "Rho signalling at a glance." J Cell Sci **117**(Pt 23): 5457-8.
- Shayesteh, L., Y. Lu, W. L. Kuo, R. Baldocchi, T. Godfrey, C. Collins, D. Pinkel, B. Powell, G. B. Mills and J. W. Gray (1999). "PIK3CA is implicated as an oncogene in ovarian cancer." Nat Genet **21**(1): 99-102.
- Shekar, S. C., H. Wu, Z. Fu, S. C. Yip, Nagajyothi, S. M. Cahill, M. E. Girvin and J. M. Backer (2005). "Mechanism of constitutive phosphoinositide 3-kinase activation by oncogenic mutants of the p85 regulatory subunit." J Biol Chem **280**(30): 27850-5.

## **Bibliographie**

- Song, J. J. and Y. J. Lee (2005). "Dissociation of Akt1 from its negative regulator JIP1 is mediated through the ASK1-MEK-JNK signal transduction pathway during metabolic oxidative stress: a negative feedback loop." *J Cell Biol* **170**(1): 61-72.
- Srinivasan, S., F. Wang, S. Glavas, A. Ott, F. Hofmann, K. Aktories, D. Kalman and H. R. Bourne (2003). "Rac and Cdc42 play distinct roles in regulating PI(3,4,5)P3 and polarity during neutrophil chemotaxis." *J Cell Biol* **160**(3): 375-85.
- Standaert, M. L., M. P. Sajan, A. Miura, G. Bandyopadhyay and R. V. Farese (2004). "Requirements for pYXXM motifs in Cbl for binding to the p85 subunit of phosphatidylinositol 3-kinase and Crk, and activation of atypical protein kinase C and glucose transport during insulin action in 3T3/L1 adipocytes." *Biochemistry* **43**(49): 15494-502.
- Sugimoto, Y., M. Whitman, L. C. Cantley and R. L. Erikson (1984). "Evidence that the Rous sarcoma virus transforming gene product phosphorylates phosphatidylinositol and diacylglycerol." *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**(7): 2117-21.
- Suzuki, H., Y. Terauchi, M. Fujiwara, S. Aizawa, Y. Yazaki, T. Kadowaki and S. Koyasu (1999). "Xid-like immunodeficiency in mice with disruption of the p85alpha subunit of phosphoinositide 3-kinase." *Science* **283**(5400): 390-2.
- Tamada, Y., H. Takama, T. Kitamura, K. Yokochi, Y. Nitta, T. Ikeya and Y. Matsumoto (1994). "Identification of programmed cell death in normal human skin tissues by using specific labelling of fragmented DNA." *Br J Dermatol* **131**(4): 521-4.
- Terauchi, Y., Y. Tsuji, S. Satoh, H. Minoura, K. Murakami, A. Okuno, K. Inukai, T. Asano, Y. Kaburagi, K. Ueki, H. Nakajima, T. Hanafusa, Y. Matsuzawa, H. Sekihara, Y. Yin, J. C. Barrett, H. Oda, T. Ishikawa, Y. Akanuma, I. Komuro, M. Suzuki, K. Yamamura, T. Kodama, H. Suzuki, K. Yamamura, T. Kodama, H. Suzuki, S. Koyasu, S. Aizawa, K. Tobe, Y. Fukui, Y. Yazaki and T. Kadowaki (1999). "Increased insulin sensitivity and hypoglycaemia in mice lacking the p85 alpha subunit of phosphoinositide 3-kinase." *Nat Genet* **21**(2): 230-5.
- Thomas, C. C., M. Deak, D. R. Alessi and D. M. van Aalten (2002). "High-resolution structure of the pleckstrin homology domain of protein kinase b/akt bound to phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate." *Curr Biol* **12**(14): 1256-62.
- Toker, A. and A. C. Newton (2000). "Akt/protein kinase B is regulated by autophosphorylation at the hypothetical PDK-2 site." *J Biol Chem* **275**(12): 8271-4.
- Tolias, K. F., L. C. Cantley and C. L. Carpenter (1995). "Rho family GTPases bind to phosphoinositide kinases." *J Biol Chem* **270**(30): 17656-9.
- Tong, T., J. Ji, S. Jin, X. Li, W. Fan, Y. Song, M. Wang, Z. Liu, M. Wu and Q. Zhan (2005). "Gadd45a expression induces Bim dissociation from the cytoskeleton and translocation to mitochondria." *Mol Cell Biol* **25**(11): 4488-500.
- Troussard, A. A., N. M. Mawji, C. Ong, A. Mui, R. St -Arnaud and S. Dedhar (2003). "Conditional knock-out of integrin-linked kinase demonstrates an essential role in protein kinase B/Akt activation." *J Biol Chem* **278**(25): 22374-8.
- Ueki, K., D. A. Fruman, C. M. Yballe, M. Fasshauer, J. Klein, T. Asano, L. C. Cantley and C. R. Kahn (2003). "Positive and negative roles of p85 alpha and p85 beta regulatory subunits of phosphoinositide 3-kinase in insulin signaling." *J Biol Chem* **278**(48): 48453-66.
- Vastrik, I., B. J. Eickholt, F. S. Walsh, A. Ridley and P. Doherty (1999). "Sema3A-induced growth-cone collapse is mediated by Rac1 amino acids 17-32." *Curr Biol* **9**(18): 991-8.
- Vivanco, I. and C. L. Sawyers (2002). "The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer." *Nat Rev Cancer* **2**(7): 489-501.

## **Bibliographie**

- von Willebrand, M., S. Williams, M. Saxena, J. Gilman, P. Taylor, T. Jascur, G. P. Amarante-Mendes, D. R. Green and T. Mustelin (1998). "Modification of phosphatidylinositol 3-kinase SH2 domain binding properties by Abl- or Lck-mediated tyrosine phosphorylation at Tyr-688." *J Biol Chem* **273**(7): 3994-4000.
- Waterman-Storer, C. M., R. A. WorthyLake, B. P. Liu, K. Burrige and E. D. Salmon (1999). "Microtubule growth activates Rac1 to promote lamellipodial protrusion in fibroblasts." *Nat Cell Biol* **1**(1): 45-50.
- Watton, S. J. and J. Downward (1999). "Akt/PKB localisation and 3' phosphoinositide generation at sites of epithelial cell-matrix and cell-cell interaction." *Curr Biol* **9**(8): 433-6.
- Welch, H., A. Eguinoa, L. R. Stephens and P. T. Hawkins (1998). "Protein kinase B and rac are activated in parallel within a phosphatidylinositol 3OH-kinase-controlled signaling pathway." *J Biol Chem* **273**(18): 11248-56.
- Welch, H. C., W. J. Coadwell, C. D. Ellson, G. J. Ferguson, S. R. Andrews, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst, P. T. Hawkins and L. R. Stephens (2002). "P-Rex1, a PtdIns(3,4,5)P3- and Gbetagamma-regulated guanine-nucleotide exchange factor for Rac." *Cell* **108**(6): 809-21.
- Wennerberg, K., K. L. Rossman and C. J. Der (2005). "The Ras superfamily at a glance." *J Cell Sci* **118**(Pt 5): 843-6.
- Whitman, M., C. P. Downes, M. Keeler, T. Keller and L. Cantley (1988). "Type I phosphatidylinositol kinase makes a novel inositol phospholipid, phosphatidylinositol-3-phosphate." *Nature* **332**(6165): 644-6.
- Whitman, M., D. R. Kaplan, B. Schaffhausen, L. Cantley and T. M. Roberts (1985). "Association of phosphatidylinositol kinase activity with polyoma middle-T competent for transformation." *Nature* **315**(6016): 239-42.
- Wymann, M. P., K. Bjorklof, R. Calvez, P. Finan, M. Thomast, A. Trifilieff, M. Barbier, F. Altruda, E. Hirsch and M. Laffargue (2003). "Phosphoinositide 3-kinase gamma: a key modulator in inflammation and allergy." *Biochem Soc Trans* **31**(Pt 1): 275-80.
- Wymann, M. P. and R. Marone (2005). "Phosphoinositide 3-kinase in disease: timing, location, and scaffolding." *Curr Opin Cell Biol* **17**(2): 141-9.
- Xia, H., R. S. Nho, J. Kahm, J. Kleidon and C. A. Henke (2004). "Focal adhesion kinase is upstream of phosphatidylinositol 3-kinase/Akt in regulating fibroblast survival in response to contraction of type I collagen matrices via a beta 1 integrin viability signaling pathway." *J Biol Chem* **279**(31): 33024-34.
- Xu, L. H., L. V. Owens, G. C. Sturge, X. Yang, E. T. Liu, R. J. Craven and W. G. Cance (1996). "Attenuation of the expression of the focal adhesion kinase induces apoptosis in tumor cells." *Cell Growth Differ* **7**(4): 413-8.
- Yu, J., Y. Zhang, J. McIlroy, T. Rordorf-Nikolic, G. A. Orr and J. M. Backer (1998). "Regulation of the p85/p110 phosphatidylinositol 3'-kinase: stabilization and inhibition of the p110alpha catalytic subunit by the p85 regulatory subunit." *Mol Cell Biol* **18**(3): 1379-87.
- Yuan, Z. Q., D. Kim, S. Kaneko, M. Sussman, G. M. Bokoch, G. D. Kruh, S. V. Nicosia, J. R. Testa and J. Q. Cheng (2005). "ArgBP2gamma interacts with Akt and p21-activated kinase-1 and promotes cell survival." *J Biol Chem* **280**(22): 21483-90.
- Zhang, B., Y. Gao, S. Y. Moon, Y. Zhang and Y. Zheng (2001). "Oligomerization of Rac1 gtpase mediated by the carboxyl-terminal polybasic domain." *J Biol Chem* **276**(12): 8958-67.
- Zhang, Q. G., X. T. Wang, D. Han, X. H. Yin, G. Y. Zhang and T. L. Xu (2006). "Akt inhibits MLK3/JNK3 signaling by inactivating Rac1: a protective mechanism against ischemic brain injury." *J Neurochem*.

## **Bibliographie**

- Zheng, Y., S. Bagrodia and R. A. Cerione (1994). "Activation of phosphoinositide 3-kinase activity by Cdc42Hs binding to p85." J Biol Chem **269**(29): 18727-30.
- Zheng, Y., M. J. Hart, K. Shinjo, T. Evans, A. Bender and R. A. Cerione (1993). "Biochemical comparisons of the *Saccharomyces cerevisiae* Bem2 and Bem3 proteins. Delineation of a limit Cdc42 GTPase-activating protein domain." J Biol Chem **268**(33): 24629-34.
- Zugasti, O., W. Rul, P. Roux, C. Peyssonnaud, A. Eychene, T. F. Franke, P. Fort and U. Hibner (2001). "Raf-MEK-Erk cascade in anoikis is controlled by Rac1 and Cdc42 via Akt." Mol Cell Biol **21**(19): 6706-17.



Annexes

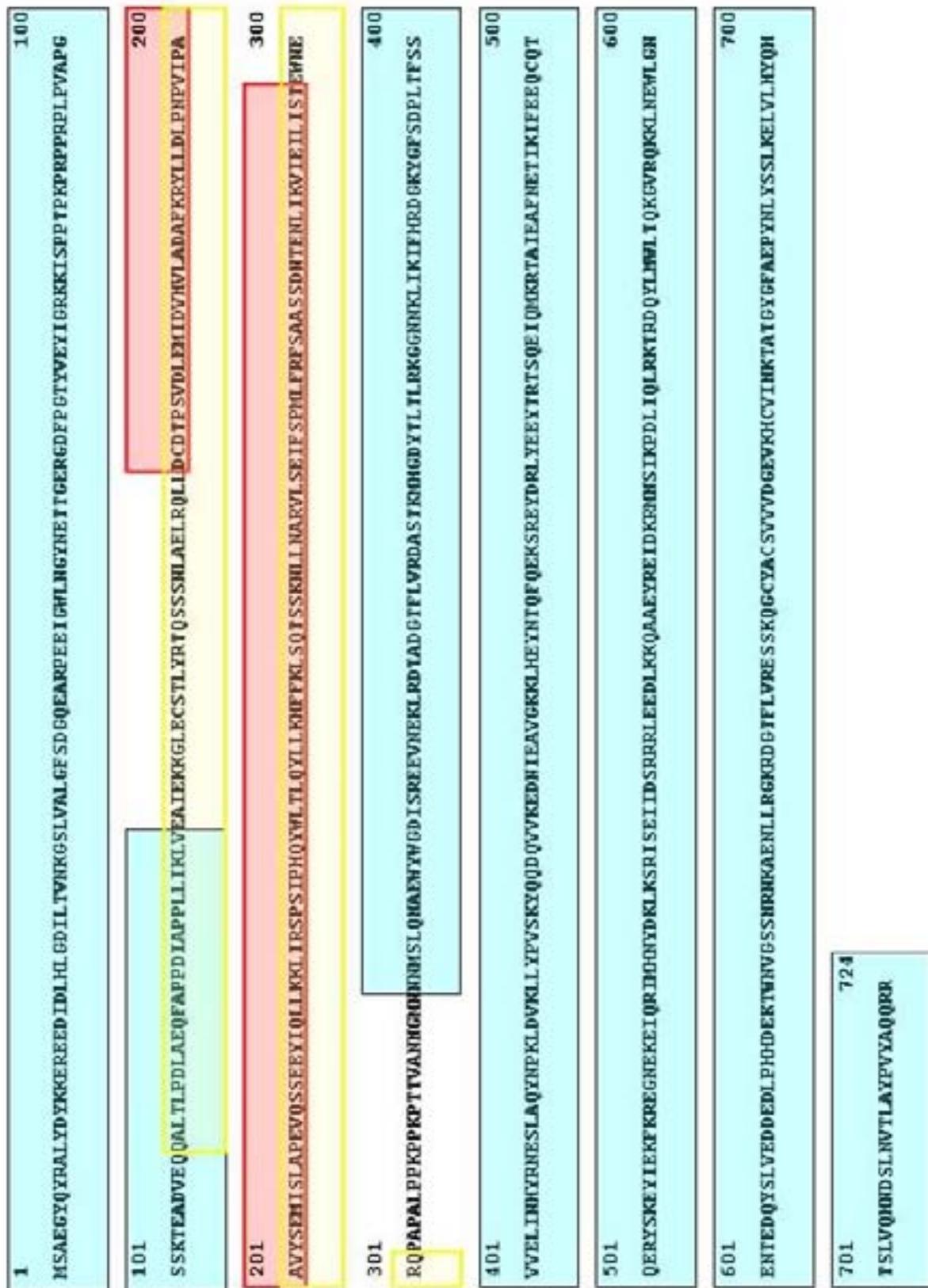


Figure 46 Séquence de P85α murine. Positionnement des différents mutants. En bleu P85αΔBH, en rouge ancien BHα, en jaune « new BHα ».



**Récapitulatif de l'ensemble des constructions obtenues**

J'ai synthétisé sous forme de tableau l'ensemble des constructions des isoformes de la sous-unité P85

**Tableau 2 Récapitulatif des constructions « P85 » obtenues lors de ce travail.**

<b>Isoforme P85 alpha</b>				
				<b>pRK5-Myc-P85α</b> (G57) Bovine
	<b>pGEX2T-P85α</b> (G33, G35) Bovine		<b>pRK5-HA-P85α</b> (G58) Bovine	<b>pEGFPCT-GFP-P85α</b> (G41) Bovine
	<b>pGEX2T-P85αΔBH</b> (G34, G36) Bovine		<b>pRK5-HA-P85αΔBH</b> (G59) Bovine	<b>pEGFPCT-GFP-P85αΔBH</b> (G40) Bovine
	<b>pGEX2T-BHα</b> (G29, G31) Mouse		<b>pRK5-HA-BHα</b> (G60) Mouse	<b>pEFbos-GFP-BHα</b> (G13) Mouse
	<b>pGEX2T-«new» BHα</b> (G70, G72) Mouse		<b>pRK5-HA-«new» BHα</b> (G74) Mouse	
<b>Isoforme P85 beta</b>				
				<b>pRK5-HA-P85β</b> (G63) Mouse
	<b>pGEX2T-P85β</b> (G42) Mouse		<b>pRK5-HA-P85βΔBH</b> (G66) Mouse	
	<b>pGEX2T-P85βΔBH</b> (G43) Mouse		<b>pRK5-HA-BHβ</b> (G61) Mouse	<b>pEFbos-GFP-BHβ</b> (G14) Mouse
	<b>pGEX2T-BHβ</b> (G30, G32) Mouse		<b>pRK5-HA-«new» BHβ</b> (G75) Mouse	
	<b>pGEX2T-«new» BHβ</b> (G71, G73) Mouse			

*Annexes*

## Résumé

La régulation des mécanismes de survie cellulaire fait intervenir de nombreuses molécules parmi lesquelles la protéine kinase Akt qui joue un rôle important.

Les travaux du laboratoire ont permis de montrer qu'il existe une voie alternative de régulation de Akt et l'objectif de ce travail a été la caractérisation de cette voie. Dans cette voie de signalisation la GTPase Rac active la protéine Akt par le biais de l'activité de la PhosphoInositide 3-Kinase (PI3K).

Nous avons pu montrer que l'une des particularités de cette voie de signalisation se manifeste par le fait que l'activation d'Akt par Rac est dépendante de l'adhérence ; en effet, cette activation ne peut se faire que lorsque les cellules sont non adhérentes. Une seconde particularité de cette voie est que Rac agit en amont de la PI3K. Nous nous sommes alors intéressés à la régulation de la PI3K au sein de cette voie et nous avons exploré la possibilité que la GTPase Rac puisse moduler l'activité de la PI3K.

*Mots clés : PhosphoInositide 3-Kinase/PI3K, Anoïkis, Akt, p85, Rac, Podosomes, adhérence, Cdc42.*

Several proteins are involved in promoting cells survival, among them the protein kinase Akt has an important role.

Our works have demonstrated that there is an alternative pathway leading to Akt activation and the aim of this work was to characterize this pathway. This alternative pathway is activated by the small GTPase Rac in a PhosphoInositide 3-Kinase-dependant manner.

Our works have demonstrated that the activation of this signaling pathway was dependent of the adherence status; indeed this pathway can be activated only in cells cultivated in an anchorage-indepent manner.

We also showed that in this alternative pathway, Rac acts upstream of PhosphoInositide 3-Kinase (PI3K), so we have studied the PI3K regulation in this pathway and we think that the small GTPase Rac could directly modulate the PI3K activity.

*Key words : PhosphoInositide 3-Kinase/PI3K, Anoïkis, Akt, p85, Rac, Podosomes, adherence, Cdc42.*