

THÈSE

Présentée à

L'UNIVERSITÉ BORDEAUX I

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

par Benjamin CHAIGNE-DELALANDE

POUR OBTENIR LE GRADE DE

DOCTEUR

SPÉCIALITÉ : Biologie Cellulaire et Moléculaire

**Implication des Rho GTPases dans la survie
cellulaire et l'adhérence :
Caractérisation d'une nouvelle voie d'activation de la kinase Akt
par Rac**

Thèse soutenue le 19 Décembre 2006

Devant la commission d'examen formée de :

M^f IJsbrand KRAMER, *Professeur*

Bordeaux

Président-Examineur

M^f Pierre ROUX, *Directeur de Recherche INSERM*

Montpellier

Rapporteur

M^f Bernard PAYRASTRE, *Directeur de Recherche CNRS*

Toulouse

Rapporteur

M^f Jean-François MOREAU, *Professeur*

Bordeaux

Examineur

M^{me} Elisabeth GENOT, *Directeur de Recherche INSERM*

Bordeaux

Directrice de thèse

« Le commencement de toutes les sciences, c'est l'étonnement de ce que les choses sont ce qu'elles sont. »

Aristote

"Si le chercheur allait à son travail sans aucune opinion préconçue, comment serait-il capable de choisir ces faits, parmi l'immense abondance de l'expérience la plus complexe, et seulement ces faits qui sont assez simples pour permettre que les connections aux règles soit évidentes ?"

Albert Einstein (1879-1955)

"Of science and the human heart, There is no limit "

U2 (Miracle Drug)

A Maman qui aurait été si fière

A Hélène sans qui rien n'aurait été possible

Remerciements

Je tiens à remercier messieurs Bernard PAYRASTRE et Pierre Roux d'avoir accepté d'être rapporteur de cette thèse, ainsi que Jean-François MOREAU d'avoir accepté d'en être l'examineur.

Je remercie ma directrice de thèse Elisabeth GENOT de m'avoir accueilli dans son laboratoire, de m'avoir encadré et accompagné au bout de ce voyage intellectuel et humain qu'est une thèse. Ses qualités scientifiques et humaines m'ont permis de développer mes qualités scientifiques et a su me conseiller efficacement tout en me laissant travailler très librement.

Je veux aussi remercier tous les membres du laboratoire, Violaine MOREAU, IJsbrand KRAMER. Les « anciens » qui ont quitté le nid pour voler de leurs propres ailes, Caroline BASONI, Christine VARON, Florence TATIN et Gueric ANIES. Les « stagiaires » dont les passages, plus ou moins longs ont toujours été synonymes de fraîcheur dans le laboratoire, Anne CHABADEL, Fabien GUEGAN. Les « nouveaux » qui vont assurer la relève, Patricia ROTTIERS, Jean-Léon MAITRE et Frédéric SALTEL. Et enfin Viviane TRIDON, pour son enthousiasme, et Edith REUZEAU sans qui le laboratoire ne tiendrait pas debout.

Je veux remercier celle qui a supporté l'envers du décor, les mauvais jours au labo, les périodes creuses et qui dans l'ombre m'a toujours soutenue, Hélène.

Enfin je veux dédier ce travail à celle qui m'a donné l'amour de la biologie et a éveillé ma vocation. Celle sans qui je ne serais jamais arrivé jusqu'ici, et qui n'aura pas eu le bonheur de voir ce travail. Maman tout ça c'est pour toi.

Abréviations

4EBP1 : eIF4E Binding Protein-1	Dbl : Diffuse B-cell lymphoma
6-PF2-K : 6-phosphofructo-2-kinase	DH : Dbl Homology
ACK : Activated Cdc42-associated Kinase	DHR1 : DOCK 180 Homology Region 1
AGC : cAMP,cGMP, Ca ²⁺ induced Kinases	DHR2 : DOCK 180 Homology Region 2
AMPc : Adénosine Monophosphate cyclique	DNA-PK : DNA Protein Kinase
AMPK : AMP Kinase	DOCK 180 : Deducator of Cytokinesis 180
APE : Akt phosphorylation enhancer	EB1/APC : End-Binding protein 1/Adenomatous Polyposis Coli
aPKC : atypical Protein Kinase C	EGF : Epidermal Growth Factor, : Epidermal Growth Factor
APPL1 : Adaptor protein containing PH domain, PTB domain and Leucine zipper motif	EH : Eps15-Homology
Arf : ADP ribosylation factor	ELMO : Engulfment and cell motility)
ArgBP2 : Arg-binding protein 2	eNOS : endothelial Nitric Oxyde Synthase
Arp2/3 : Actin-related protein 2/3	ENTH : Epsin N-Terminal Homology
AS160 : Akt Substrate of 160 kDa	ERM : Ezrin Radixin Moesin, : Ezrin Radixin Moesin
AS47 : Akt Substrate 47 kDa	ESS : Extended SH2 Subdomain
ASK1 : Apoptosis Signal-regulating Kinase 1	Etk : Epithelial and endothelial tyrosine kinase
BAR : Bin, Amphiphysin, Rvs	FADD : FAS-Associated Death Domain protein
Bcr : Breakpoint Cluster Region	FAK : Focal Adhesion Kinase
BCR : B-Cell Receptor	FNR III : Fibronectin type III Repeat
BH : Bcr Homology	Ft1 : Fused toes 1
Bim : Bcl-2 interating mediator of cell death	FYVE : Fab-1, YGL023, Vps27, and EEA1
BORG : Binder Of Rho GTPases	Gab2 : Grb associated binder 2
Btk : Bruton Tyrosine Kinase	GAP : GTPase Activating Protein
C1 : Protein kinase C conserved region 1	GDI : Guanine nucleotide Dissociation Inhibitor
C2 : Protein kinase C conserved region 2, : Protein kinase C conserved region 2	GDP : Guanosine DiPhosphate
Cdc42 : Cell division cycle 42 homolog	GEF : Guanine nucleotide Exchange Factor
CDK : Cyclin Dependent Kinase	GLUT4 : Glucose Transporteur 4
CDKI : Cyclin Dependant Kinase Inhibitor	GMPPNP : Guanosine-5'-(beta gamma-imino)triphosphate
CH : Calponin Homology	GPI : Glycosyl Phosphatidyl Inositol
CIS : Cytokine Inducible SH2-containing protein).	Grb : Grouth factor Receptor Bound
CK2 : Casein Kinase 2	GRP1 : General Receptor for PI
CLIP170 : Cytoplasmic LInker Protein 170	GSK3β : Glycogen Synthase Kinase 3 α , : Glycogen Synthase Kinase 3 β
COMT : Centre Organisateur de Microtubule	GTP : Guanosine TriPhosphate
CREB : Cyclic AMP Response Element Binding protein	HM : Hydrophobic Motif
CRH : Cytokine Receptor Homology	HR1 : Homology Region 1
CRIB : Cdc42/Rac Interactive Binding	Hsp : Heat Shock Protein
CRMP 2 : Collapsin Response Mediator Protein 2	ICAM : Intercellular Cell Adhesion Molecule
CRP : Complement Regulatory Protein	IEL : Intraepithelial Lymphocytes
CTMP : C-Terminal Modulator Protein	Ig : Immunoglobulines
DAG : Diacylglycérol	

IL-15 LSP : IL-15 Long Signal Peptide	N-WASP : Neural Wiskott-Aldrich Syndrome Protein
IL-2Rβ : Interleukin 2 Receptor β	p70^{S6K} : p70 S6 Kinase
ILK : Integrin-Linked Kinase	p90^{RSK} : p90 Ribosomal S6 Kinase
IMPDH : Inosine-5' Monophosphate Déhydrogenase	PAK : p21-activated kinase
IQGAP : IQ motif containing GAP homologue	PCNA : Proliferating Cell Nuclear Antigen
IRAP : Insulin-Responsive Amino Peptidase	PDE3B : Phosphodiesterase 3B
IRS : Insulin Receptor Subunit	PDGF : Platelet-Derived Growth Factor
ITIM : Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibition Motif	PDK1 : PI Dependent Kinase 1
Itk : Inductible T cell Kinase	PDZ : PSD95/DlgA/ZO-1
IκB : I κ B Kinase	PECAM : Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule
JAK : Janus Kinase	PED/PEA-15 : Phosphoprotein Enriched in Diabetes/Astrocytes 15
JH : Janus Homology	PH : Plekstrin Homology
JIP1 : JNK Interacting Protein 1	PHLPP : PH Leucine-rich repeat Protein Phosphatase
JNK : c-Jun N-Termniale Kinase	PI : Phosphatidylinositol
KIR : Kinase Inhibitory Region	PI3K : PI 3-Kinase
LIMK : LIM Kinase	PIAS : Protein Inhibitor of Activated STAT
LPA : Lysophosphatidic Acid	PIK : PI Kinase homology
LZ : Leucine Zipper	PIKFyve : FYVE domain-containing PI3P 5-Kinase
MAL : Megakaryocytic Acute Leukemia	PIP : Phosphoinositides Phosphates
MAPK : Mitogen Activated Protein Kinase	PIP5K : Phosphoinositide-4-Phosphate 5 Kinase
MAPKAP-K2 : MAPK Activated Protein Kinase 2	Pix : PAK-interacting exchange factor
MAPKKK : MAP Kinase Kinase Kinase	PKB : Protein Kinase B
MAST205 : Microtubule-Associated Serine/Threonine kinase	PLC : Phospholipase C
MBP : Myelin Basic Protein	POSH : Plenty Of SH3
mDia1 murine Diaphanous formin 1	PR : Proline Rich, : Proline Rich Motif
Mdm2 : Murine double minute 2	PRK2 : Protein Kinase C-Related Kinase-2
MEC : Matrice extracellulaire	PTB : PhosphoTyrosine Binding
MEK : MAPK/ERK Kinase	PTEN : Phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10
MEKK4 : MAP/ERK Kinase Kinase 4	PTP : Protein Tyrosine Phosphatase
MKP : MAPK Phosphatases	PTP1B : Protein Tyrosine Phosphatase 1B
MLC : Myosin Light Chain	Pyk2 : Proline-rich Tyrosine kinase 2
MLCK : MLC Kinase	Rab : Ras-related in brain
MLCP : MLC Phosphatase	Rac : Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1
MLK : Mixed-Lineage Kinase	RAC : Related with Protein Kinase A and C Protein Kinase
MMAC1 : Mutated in Multiple Advanced Cancers	Ran : Ras-related in nuclear import and export
MRCK : Myotonic dystrophy kinase-Related Cdc42 binding Kinase	Raptor : Regulatory associated protein of mTOR
mTOR : mammalian Target Of Rapamycin	RBD : Ras Binding Domain
NADPH : Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate Hydrogen	RBD I : Rho Binding Domain type I
NCAM : Neural Cell Adhesion Molecule	Rho : Ras homologous
NIK : NF κ B-Inducing Kinase	Rictor : Rapamycin insensitive companion of mTOR
NK : Natural Killer	RIP : Receptor Interacting Protein
NO : Nitric Oxyde	ROS : Reactive Oxygen Species
	RPTP : Receptor Protein Tyrosine-Phosphatase

S1P : Sphingosine 1-Phosphate	TCL1 : T-Cell Leukemia 1
SAM : Sterile Alpha Motif	TERT : Telomerase Reverse Transcriptase
SBE : STAT Binding Elements	Tiam1 : T-cell lymphoma invasion and metastasis 1
SGK : Serum and Glucocorticoid induced Protein Kinase	TNF R : Tumor Necrosis Factor Receptor
SH2 : Src Homology region 2	Toca-1 : Transducer of Cdc42-dependent actin assembly
Shc : SH2-containing collagen-related protein	TRADD : TNF Receptor type I Associated Death Domain
SHIP : SH2 containing Inosititide 5 Phosphatase	TRAF2 : TNF-R Associated Factor 2
SHP1 : SH2-containing phosphatase 1	TRAIL : TNF Related Apoptosis-Inducing Ligand
SHP2 : SH2 containing phosphatase 2	Trb3 : Tribble 3
SOCS : Suppressors Of Cytokine Signaling	TSC1/2 : Tuberous Sclerosis Complex 1/2
SoHo : Sorbin Homology	VCAM : Vascular Cell Adhesion Molécule
Sos : Son of sevenless	Vps34p : Vacuolar-protein-sorting 34 protein
SRE : Serum Response Element	WAVE : WASP family Verprolin-homologous
SRF : Serum Response Factor	X-SCID : X linked Severe Combined Immunodeficiency
STAT : Signal Transducer and Activator if Transcription	YAP : Yes-Associated Protein
Syk : Spleen tyrosyne kinase	

Abréviations des Acides Aminés

Nom	Code		Nom	Code	
	1 lettre	3 lettres		1 lettre	3 lettres
Alanine	A	Ala	Leucine	L	Leu
Arginine	R	Arg	Lysine	K	Lys
Asparagine	N	Asn	Méthionine	M	Met
Aspartate	D	Asp	Phénylalanine	F	Phe
Cystéine	C	Cys	Proline	P	Pro
Glutamate	E	Glu	Sérine	S	Ser
Glutamine	Q	Gln	Thréonine	T	Thr
Glycine	G	Gly	Tryptophane	W	Trp
Histidine	H	His	Tyrosine	Y	Tyr
Isoleucine	I	Ile	Valine	V	Val

Tableau 1 : Abréviations des Acides Aminés

Sommaire

Remerciements	iii
Abréviations	v
Sommaire	viii
Liste des Figures	xi
Liste des Tableaux	xiii
Avant-Propos	1
Introduction	3
Section I : Les petites protéines G de la famille Rho	5
I - La famille des Rho GTPases	5
A - Généralités.....	5
B - Quelques données structurales	8
C - La biologie des Rho GTPases : notion d'interrupteurs moléculaires	10
II - Les fonctions des Rho GTPases	19
A - Les Rho GTPases et le cytosquelette : de la forme au mouvement.....	19
B - Les Rho GTPases, la croissance et survie cellulaire	26
Section II : Les Phosphoinositides Phosphates et les Phosphoinositides 3-Kinases	30
I - Les Phosphoinositides	30
A - Généralités.....	30
B - Biologie des Phosphoinositides.....	30
II - Les Phosphoinositides 3-Kinase : PI3Ks	34
A - Généralités.....	34
B - Les 3 classes de PI3Ks.....	35
C - La biologie des PI3Ks de type IA.....	37
III - Les PI Phosphatases	42
A - La PI 3-Phosphatase, PTEN.....	42
B - La PI 5-Phosphatase, SHIP	44
Section III : La Kinase Akt.....	47
I - Généralités.....	47
A - Généralités.....	47
B - Isoformes d'Akt et données des souris KO.....	47
C - Quelques données structurales	49
II - Mécanismes de l'activation et de régulation d'Akt.....	51
A - Les signaux qui activent Akt.....	51
B - Le mode d'activation d'Akt.....	51
III - Les modulateurs de l'activité d'Akt.....	55
A - Les phosphatases régulant l'activité d'Akt	55
B - Les protéines interagissant et modulant l'activité d'Akt.....	56
C - Les inhibiteurs pharmacologiques d'Akt.....	58
IV - Les fonctions d'Akt.....	58
A - Les substrats d'Akt	58
B - Akt et Cancer	64

Section IV : La survie cellulaire	67
I - La survie : une inhibition de l'apoptose ?	67
A - Généralités.....	67
II - Adhérence et survie cellulaire	69
A - Généralités.....	69
B - Les molécules intervenant dans l'adhérence cellule-cellule	69
C - Les molécules intervenant dans l'adhérence cellule-matrice	72
III - La perte de l'adhérence : mort ou survie ?	77
A - L'apoptose en condition non adhérente : L'anoïkis	77
B - La survie en condition non adhérente : les lymphocytes T mémoires.....	78
Chapitre 1 : GTPase et survie cellulaire	79
Section I : Une nouvelle voie de régulation d'Akt par la GTPase Rac et SHIP dans les cellules non-adhérentes.....	81
I - Introduction	81
II - Article 1	82
A - Abstract	83
B - Introduction	84
C - Results	86
D - Discussion.....	96
III - Données supplémentaires	104
A - Localisation cellulaire de Rac, activité de Rac et morphologie cellulaire	104
B - La colocalisation de Rac1-GTP et S ⁴⁷³ Akt est augmentée dans les cellules non adhérentes.....	108
C - Vers une mise évidence de la voie Rac1/Akt endogène.....	110
D - Développement d'outils moléculaires pour l'étude de la voie Rac1/Akt	115
IV - Discussion	119
Section II : Etude de la signalisation de l'IL-15	122
I - Introduction	122
II - Résultats	122
A - Les doses et les cinétiques de réponse de l'IL-2 et de l'IL-15 sont différentes	122
B - L'IL-15 et l'IL-2 induisent l'activation de Rac1, avec des cinétiques différentes.....	124
III - Discussion.....	126
Chapitre 2 : Rho GTPases et cytosquelette, implication dans une pathologie : la leucémie à Tricholeucocytes	127
Section I : La leucémie à Tricholeucocytes	129
I - Physiopathologie de la leucémie à Tricholeucocytes	129
A - Généralités.....	129
B - Aspect clinique de la pathologie	129
C - Biologie de la cellule pathognomonique : le Tricholeucocyte.....	129
II - Les traitements de la Leucémie à Tricholeucocytes.....	131
A - La splénectomie	131
B - L'interféron- α (IFN- α)	131
C - Les analogues de purines	132
D - Immunothérapies	132
Section II : Article 2.....	133

Chapitre 3 : L'étude des podosomes <i>in vivo</i>	147
Section I : Introduction	149
Section II : Matériel et méthodes.....	151
I - Modèles d'étude.....	151
II - Acquisition des données	153
A - Marquage : protocole spécifique.....	153
B - Lecture et analyse.....	153
Section III : Résultats	154
I - Le marquage des cellules <i>in vivo</i> est différent du marquage <i>in vitro</i>	154
II - Le modèle de chambre d'incubation ne convient pas à l'étude des podosomes <i>in vivo</i>	155
Section IV : Conclusion.....	159
Discussion Générale	161
Matériel et Méthodes	169
Section I Biologie cellulaire	171
I - La culture cellulaire	171
II - Transfection	171
III - Les tests cellulaires.....	173
A - Les tests de proliférations.....	173
B - Les tests d'adhérence.....	173
C - Test d'apoptose	173
Section II Biologie Moléculaire	173
I - Les plasmides utilisés	173
II - Les techniques de bases	174
A - Transformation de bactéries	174
B - Préparation d'ADN plasmidique par maxi-préparation.....	174
III - Sous-clonage d'un fragment d'ADN dans un plasmide	175
A - Généralités.....	175
B - Méthode de sous-clonage	175
Section III Biochimie	176
I - Anticorps	176
II - Les méthodes de précipitations sélectives	176
A - Les Immunoprécipitations.....	176
B - Les expériences de précipitations sélectives.....	177
III - Fractionnement Cellulaire	177
IV - Immunofluorescence	178
A - Les marquages.....	178
B - Microscopie	178
Bibliographie	179

Liste des Figures

Figure 1: La superfamille des GTPases monomériques.....	5
Figure 2 : Structure des Rho GTPases	9
Figure 3 : le Cycle d'activation/désactivation des GTPases.....	10
Figure 4 : Les Régulateurs des Rho GTPases	13
Figure 5 : Le réseau des effecteurs des Rho GTPases.....	17
Figure 6 : Rho GTPases et régulation du cytosquelette	23
Figure 7 : Rho GTPase et migration cellulaire.....	25
Figure 8: Le métabolisme des Phosphoinositides	32
Figure 9 : La famille des PI3Ks	37
Figure 10 : Structure et régulation des PI3Ks I _A	41
Figure 11 : Les PI-Phosphatases PTEN et SHIP.....	44
Figure 12 : Les différentes isoformes d'Akt.....	49
Figure 13 : Modèle d'activation d'Akt.....	54
Figure 14 : Les protéines interagissant avec Akt	57
Figure 15 : Les voies de signalisation d'Akt	66
Figure 16 : L'apoptose.....	68
Figure 17 : Les molécules d'adhérence Cellule-Cellule et leurs ligands.....	70
Figure 18 : La matrice extracellulaire	72
Figure 19 : Les Intégrines.....	74
Figure 20 : Both Rac1 and Rac2 can regulate Akt activity	87
Figure 21 : Lack of PTEN in Jurkat cells does not promote Rac1-induced Akt stimulation... 88	88
Figure 22 : Lack of SHIP promotes Rac1-induced Akt stimulation	89
Figure 23 :Active Rac selectively stimulates Akt activity in non-adherent cells.....	90
Figure 24 : Rac stimulates Akt activity in suspended cells, regardless of their cell lineage....	91
Figure 25 : Both adhesion and SHIP antagonize the activation of Akt by Rac1	93
Figure 26 : The association of Rac and Akt in a complex is dependent on Rac activation status, the presence of an intact PH domain, functional PI3K and is negatively regulated by adhesion.....	94
Figure 27 : Rac does not require membrane association to stimulate Akt in suspended cells.	96
Figure 28 : Model of Rac-stimulated Akt activation in non-adherent cells.....	98
Figure 29 : Phénotype cellulaire induit par l'expression des mutants de Rac1	106

Figure 30 : Localisation de Rac1 et Rac1-GTP dans des cellules RBL adhérentes et non-adhérentes. Les cellules RBL 2H3 ont la propriété de pousser, en culture, de manière adhérente et non adhérente.....	107
Figure 31 : Localisation de Rac1-GTP et S ⁴⁷³ Akt dans des RBL adhérentes et non-adhérentes	109
Figure 32 : Seules les formes phosphorylées d'Akt interagissent avec V12-Rac.....	110
Figure 33 : Présentation du modèle A20.....	111
Figure 34 : Validation du modèle A20.....	112
Figure 35 : Les phosphorylations T ³⁰⁸ et S ⁴⁷³ d'Akt sont augmentées dans les cellules A20 non adhérentes.....	113
Figure 36 : SHIP interagit avec p130 ^{CAS} dans les cellules adhérentes.....	115
Figure 37 : p85 interagit avec Akt.....	116
Figure 38 : Alignement des séquences de p85 α et p85 β	117
Figure 39 : les mutants des sous unités p85 α et p85 β	118
Figure 40 : Le domaine BH α interagit avec Rac1	119
Figure 41 : IL-2 et IL-15 stimulent la croissance cellulaire et la phosphorylation d'Akt mais de façon distincte.....	123
Figure 42 : IL-2 et IL-15 ont des cinétiques d'activation d'Akt différentes	124
Figure 43 : Rac est activée par l'IL-15 d'une manière indépendante de l'activité de la PI3K125	
Figure 44 : Structure des podosomes	150
Figure 45 : le modèle de la "chambre d'incubation".	152
Figure 46 : Le modèle de la "lésion".	153
Figure 47 : Le marquage de la vinculine diffère entre les cellules en culture et l'endothélium natif.....	155
Figure 48 : Le PMA n'induit pas de modification détectable de l'organisation du cytosquelette d'Actine.....	156
Figure 49 : La création d'une zone de reflux induit des structures de type rosettes de podosomes.....	157
Figure 50 : Le SB431542 diminue le marquage Phospho-SMAD avec ou sans ligature	159

Liste des Tableaux

Tableau 1 : Abréviations des Acides Aminés	vii
Tableau 2 : Les membres de la famille des Rho GTPases et leurs fonctions principales	7
Tableau 3 : Les régulateurs de l'activité des Rho GTPases.....	14
Tableau 4 : Toxines Bactériennes et Rho GTPases.....	16
Tableau 5 : Mutations des Rho GTPases	18
Tableau 6 : Les composants principaux du cytosquelette	19
Tableau 7 : Les Phosphoinositides, leurs localisations et leurs fonctions.....	31
Tableau 8 : Les domaines d'interaction avec les PIPs.....	33
Tableau 9 : Comparaison des propriétés des inhibiteurs de la PI3K , Wortmannin et LY294002.....	42
Tableau 10 : Comparaison des 3 Isoformes d'Akt.....	48
Tableau 11 : Les activateurs d'Akt	51
Tableau 12 : Les PDK2 potentielles.....	53
Tableau 13 : Les protéines interagissant avec Akt.....	56
Tableau 14 : Les Inhibiteurs d'Akt	58
Tableau 15 : Akt intervient dans les processus impliqués dans le cancer.....	64
Tableau 16 : Les protéines interagissant avec les Intégrines.	76
Tableau 17 : Conditions de culture Cellulaires des différentes lignées utilisée.....	172
Tableau 18 : Anticorps utilisés.....	176

Avant-Propos

Au sein de l'organisme, les cellules sont en permanence soumises à de nombreux stimuli issus de leur environnement. La survie cellulaire résulte d'un équilibre de l'intégration de ces stimuli en signaux de survie et signaux de mort. Un déséquilibre de cette balance peut aboutir soit à une favorisation des signaux de mort (associée aux maladies dégénératives), soit à une favorisation des signaux de survie (associée au cancer). La compréhension des mécanismes qui contrôlent la survie cellulaire est donc un enjeu majeur dans la compréhension et l'élaboration de traitement pour de nombreuses pathologies.

Depuis plus d'une vingtaine d'années l'étude des Rho GTPases a permis de mettre en évidence leur rôle central dans la signalisation cellulaire. Ainsi, si leurs implications dans la régulation du cytosquelette ont été étudiées (et le sont toujours), d'autres fonctions sont associées aux Rho GTPases, et plus particulièrement leurs implications dans le contrôle de la survie cellulaire. Une des voies les plus connues de contrôle de la survie cellulaire est la voie de signalisation de la Sérine/Thréonine kinase Akt/PKB. Cette voie de signalisation fait intervenir des lipides membranaires, les Phosphoinositides ainsi que des lipides kinases et phosphatases, telles que PI3K (Phosphoinositides 3 Kinase), PTEN (Phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10) ou SHIP (SH2 containing Inositide 5 Phosphatase).

Le travail de thèse exposé dans ce manuscrit, est centré sur l'étude des GTPases de la famille Rho via 2 aspects, le premier s'intéresse à la survie cellulaire et le second à la régulation du cytosquelette dans le cadre d'une pathologie atypique, la leucémie à Tricholeucocytes. La dernière partie est une étude préliminaire visant à observer *in vivo* une structure d'adhérence particulière, les podosomes.

Dans l'introduction qui suit vous seront exposés les acteurs principaux de notre recherche, les GTPases de la famille Rho, les Phosphoinositides, la kinase Akt, et quelques notions sur la survie cellulaire. L'ensemble de ces données devraient permettre d'aborder les différents sujets traités dans ce manuscrit avec le plus de facilités possibles.

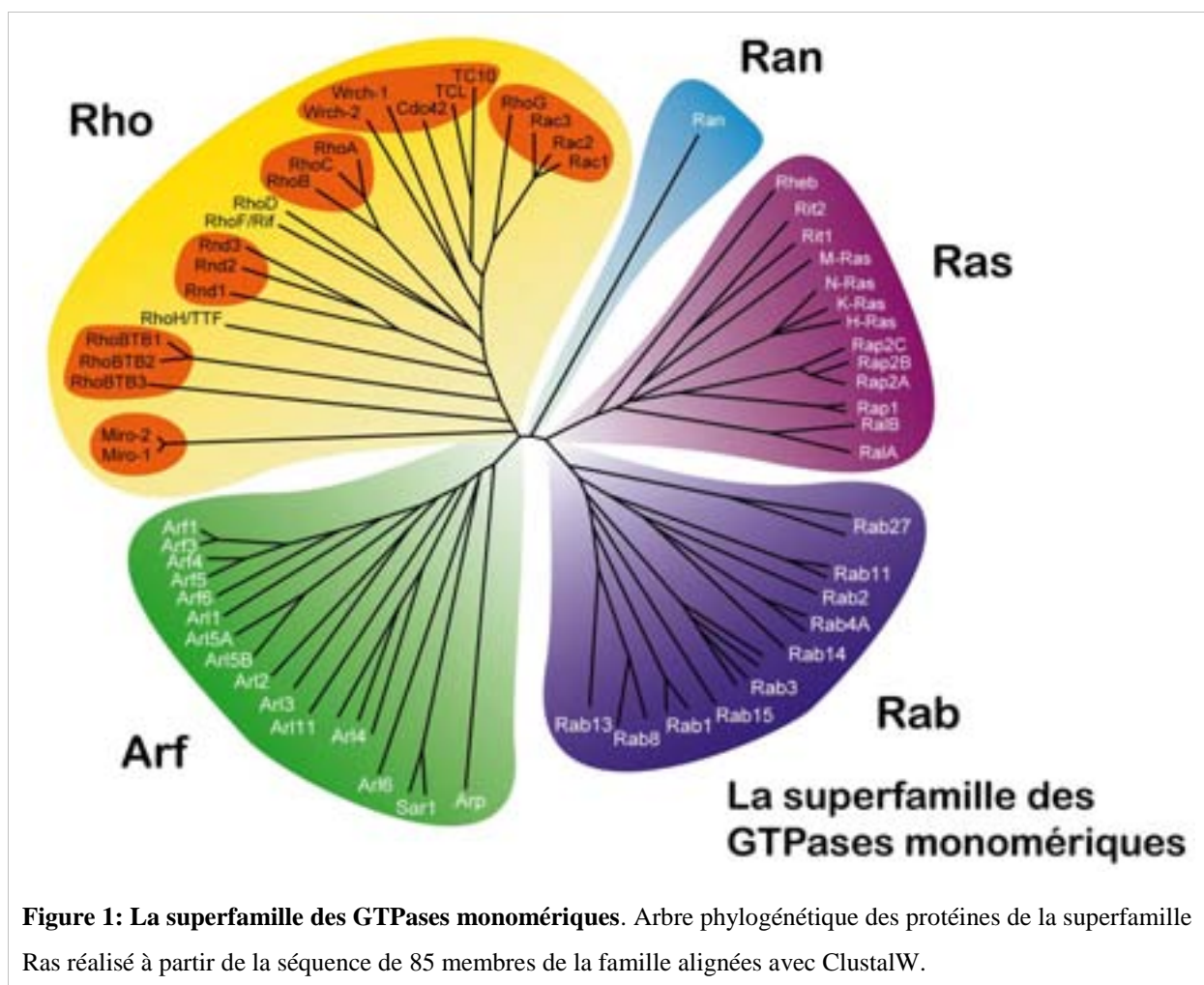
Introduction

Section I : Les petites protéines G de la famille Rho

I - La famille des Rho GTPases

A - Généralités

Les petites protéines G ou petites GTPases appartiennent à la grande classe des protéines capables de fixer le GTP (Guanosine Triphosphate). Contrairement aux autres protéines G (protéines G hétérotrimériques, EF-Tu, dynamine, ...), elles sont monomériques et de petit poids moléculaire (entre 20 et 40 kDa). Le prototype de cette superfamille protéique est Ras, clonée au début des années 80 (Der *et al.*, 1982). Depuis, la superfamille des petites protéines G s'est agrandie, elle comprend aujourd'hui plus de 150 protéines réparties en 5 familles: Ras, Rab (Ras-related in brain), Ran (Ras-related in nuclear import and export), Rho (Ras homologous) et Arf (ADP ribosylation factor) (Figure 1). Elles sont impliquées dans des processus cellulaires fondamentaux, comme la différenciation et la prolifération cellulaire, l'organisation et la dynamique du cytosquelette, ou encore les transports intracellulaires.



La famille des Rho GTPases comprend, chez l'homme, 22 gènes et au moins 23 protéines (Wherlock & Mellor, 2002; Wennerberg & Der, 2004). Les protéines appartenant à cette famille sont elles-mêmes classées en 7 sous-familles sur la base de leur séquence primaire. Les GTPases de la famille Rho sont impliquées dans la régulation de nombreuses fonctions cellulaires telles que l'organisation du cytosquelette, l'expression de gènes, la prolifération cellulaire, le trafic vésiculaire, (*Tableau 2*). Dans cet exposé nous nous focaliserons principalement sur les GTPases Rho, Rac (Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1), Cdc42 (Cell division cycle 42 homolog).

Comme la plupart des petites protéines G, les Rho GTPases se comportent comme des interrupteurs moléculaires capables d'osciller entre un état inactif (lié au GDP (Guanosine Diphosphate)) et un état actif (lié au GTP). Cette caractéristique est la conséquence d'un cycle moléculaire GDP/GTP (détaillé page 10); *Figure 3*) faisant intervenir des molécules régulatrices fondamentales dans la biologie des GTPases, les facteurs d'échange GDP/GTP (GEF : Guanine nucleotide Exchange Factor) et les protéines activatrices de GTPases (GAP : GTPase Activating Protein). En dehors de ce cycle, il existe une autre classe de régulateurs des petites protéines G, les inhibiteurs de la dissociation du GDP (GDI : Guanine nucleotide Dissociation Inhibitor). Dans leur état actif, liées au GTP, les Rho GTPases sont capables d'interagir et d'activer de nombreuses protéines impliquées dans de nombreuses fonctions cellulaires, elles sont désignées sous le terme d'effecteurs.

		Expression		C-Ter		Fonctions	Références
		Localisation	Régulée	Pr	Pal		
Rho	RhoA	Ubiquitaire		GG		Organisation du cytosquelette Transcription de Gènes ; Survie cellulaire ; Prolifération cellulaire	(Aspenstrom <i>et al.</i> , 2004) (Aznar & Lacal, 2001)
	RhoB	Ubiquitaire	Oui	GG/F	Oui	Prolifération cellulaire Survie cellulaire S'oppose aux effets de RhoA et RhoC	(Huang & Prendergast, 2006) (Fernandez-Borja <i>et al.</i> , 2005) (Chen <i>et al.</i> , 2000)
	RhoC	Ubiquitaire		GG		Transcription (rôle dans l'oncogenèse)	(Clark <i>et al.</i> , 2000)
Rac	Rac1	Ubiquitaire		GG		Organisation du cytosquelette Transcription de gènes ; Survie cellulaire ; Prolifération cellulaire	(Aspenstrom <i>et al.</i> , 2004) (Aznar & Lacal, 2001)
	Rac2	Hématopoïétique		GG		Exocytose (Neutrophiles) Production d'ions superoxyde (Neutrophiles)	(Abdel-Latif <i>et al.</i> , 2004) (Carstanjen <i>et al.</i> , 2005)
	Rac3	Cerveau, Cœur, Pancréas	Oui	GG		Transcription, Survie cellulaire (rôle dans l'oncogenèse)	(Keller <i>et al.</i> , 2005)
	RhoG	Ubiquitaire	Oui	GG		Active Rac1 et Cdc42 Endocytose	(Prieto-Sanchez & Bustelo, 2003) (Wennerberg <i>et al.</i> , 2002)
Cdc42	Cdc42	Ubiquitaire		GG		Organisation du cytosquelette Transcription de gènes ; Survie cellulaire ; Prolifération cellulaire	(Aspenstrom <i>et al.</i> , 2004) (Aznar & Lacal, 2001)
	TC10	Cœur, Muscle squelettique		F	Oui	Organisation du cytosquelette Elongation neuronale	(Neudauer <i>et al.</i> , 1998) (Tanabe <i>et al.</i> , 2000)
	TCL	Cœur, Poumon, Foie		F ?	Oui	Organisation du cytosquelette Croissance neuronale	(Vignal <i>et al.</i> , 2000) (Abe <i>et al.</i> , 2003)
	Chp/Wrch-2	Cerveau, Rate, Testicule		-		Organisation du cytosquelette	(Aronheim <i>et al.</i> , 1998)
	Wrch-1		Oui	GG ?	Oui	Organisation du cytosquelette	(Tao <i>et al.</i> , 2001)
Rnd	Rnd1	Cerveau, Foie		F		Antagonisent les effets de RhoA	(Nobes <i>et al.</i> , 1998; Chardin, 2006; Riento <i>et al.</i> , 2005)
	Rnd2	Cerveau, Testicule		F			
	Rnd3/RhoE	Ubiquitaire	Oui	F			
RhoBTB	RhoBTB1	Ubiquitaire		-		Contrôle de la prolifération cellulaire ?	(Hamaguchi <i>et al.</i> , 2002; Ramos <i>et al.</i> , 2002)
	RhoBTB2	Cerveau		-			
	RhoBTB3	Ubiquitaire		-			
Miro	Miro-1	Ubiquitaire		-		Induction de l'apoptose	(Fransson <i>et al.</i> , 2003)
	Miro-2	Ubiquitaire		-		Trafic Mitochondrial	(Fransson <i>et al.</i> , 2006)
Autre	RhoD	?		F		Organisation du cytosquelette Trafic Endosomal	(Gasman <i>et al.</i> , 2003) (Murphy <i>et al.</i> , 1996)
	RhoF/Rif	Ubiquitaire				Organisation du cytosquelette	(Ellis & Mellor, 2000)
	RhoH/TTF	Hématopoïétique	Oui			Régulation négative des autres Rho GTPases	(Li <i>et al.</i> , 2002a)

Tableau 2 : Les membres de la famille des Rho GTPases et leurs fonctions principales. Ce tableau est un résumé non exhaustif de l'expression, des modifications post-traductionnelles et des grandes fonctions des Rho GTPases. Abréviations : C-Ter : extrémité C-Terminale ; Pr : Prénylation ; GG : Géranylgeranyl ; F : Farnésyl ; Pal : Palmoylation.

B - Quelques données structurales

La structure des Rho GTPases est très conservée, elles sont constituées d'environ 190 acides aminés pour un poids moléculaire de l'ordre de 21 kDa. Elles présentent de 45 à 95% d'identité entre elles et 30% avec Ras (Wennerberg & Der, 2004). Au niveau structural, les Rho GTPases sont caractérisées par un domaine G (pour GT Pase) et une séquence C-terminale susceptible de subir des modifications post-traductionnelles.

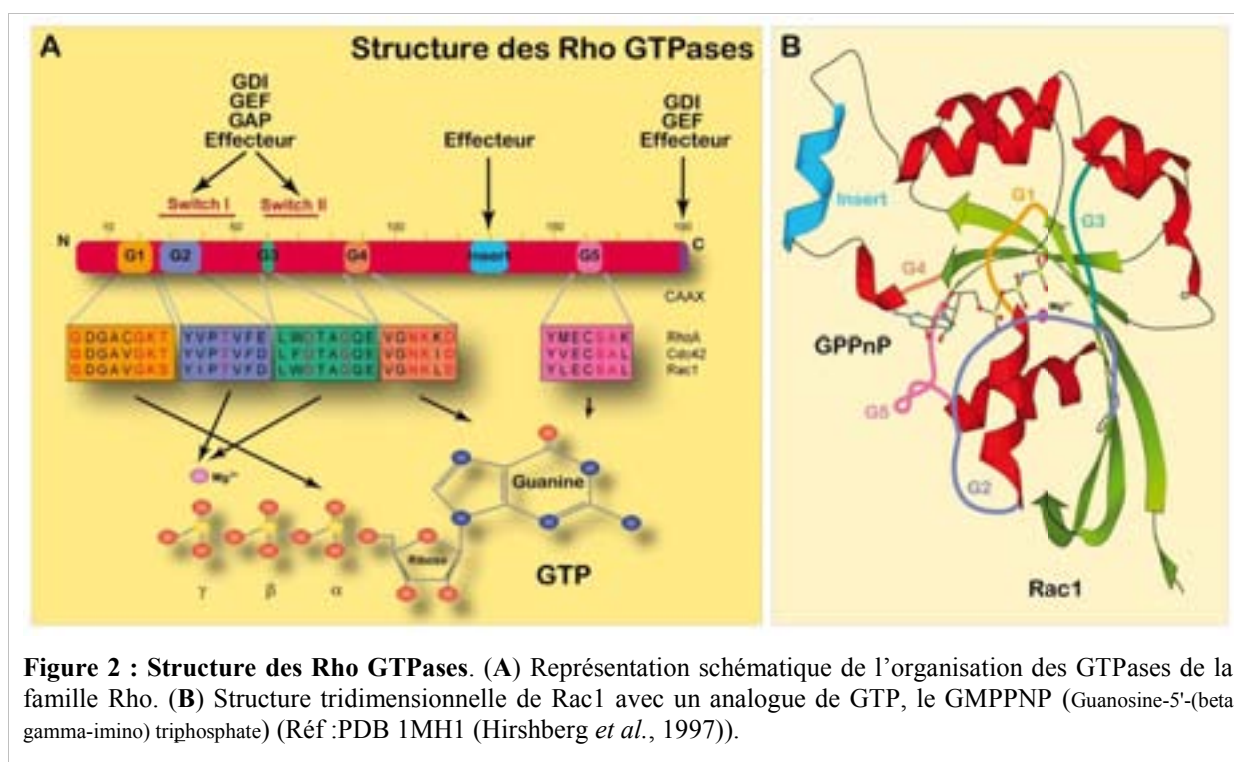
1 - Le domaine G

Les analyses cristallographiques et spectroscopiques de nombreuses protéines G ont permis de caractériser le domaine GTPase commun à toute la superfamille des petites protéines G. Dans les Rho GTPases le domaine G représente environ 90% de la protéine (sauf pour les protéines Miro et RhoBTB). Il est constitué de 5 hélices α (A1-A5), de 6 feuillets β (B1-B6) et de 5 boucles G (G1-G5) (Bourne *et al.*, 1991; Sprang, 1997) (*Figure 2*). En outre, le domaine G des Rho GTPases contient une hélice α supplémentaire en C terminale, propre à la famille, appelée la région « Insert » (position 123-135 dans la séquence de Rac1) (Valencia *et al.*, 1991). Contrairement à la règle générale selon laquelle les régions les plus conservées des protéines sont les régions impliquées dans des structures secondaires, les régions les plus conservées du domaine GTPase sont les boucles G1 à G5. Plusieurs études structurales ont permis de déterminer que ces boucles sont les régions d'interaction entre la GTPase et le nucléotide (GTP/GDP), les régulateurs et les effecteurs (Paduch *et al.*, 2001).

La liaison au nucléotide est assurée par les boucles G1 à G5. La boucle G1 (position 10-18) ou P-Loop assure la liaison avec les groupements phosphates α et β du nucléotide. La boucle G2 (position 25-39) contient une thréonine conservée qui assure la liaison des ions Mg^{2+} . La boucle G3 (position 58-62) contient des acides aminés assurant la liaison au groupement phosphate γ et aux ions Mg^{2+} . Les boucles G4 (position 84-87) et G5 (position 157-165) assurent la liaison à la guanine (Bourne *et al.*, 1991; Sprang, 1997). Une étude comparative de la séquence des Rho GTPases a permis de montrer que les boucles G1 et G4 sont plus conservées que les boucles G2 et G3, ce qui pourrait être la base structurale de la spécificité des effecteurs et de l'activité GTPasique des Rho GTPases (Paduch *et al.*, 2001).

La liaison aux effecteurs ainsi qu'aux régulateurs des Rho GTPases dépend principalement de 2 régions, appelées Switch I (position 25-49) et Switch II (position 56-76) (Wei *et al.*, 1997; Ihara *et al.*, 1998). La région Switch I (qui contient la boucle G2), aussi appelé la « boucle effectrice », est indispensable à la liaison des effecteurs et des GAPs (Spoerner *et al.*, 2001). La région Switch II (qui contient la boucle G3) est la zone la plus

flexible du domaine GTPase, c'est aussi une région importante pour l'interaction avec les GEFs (Karnoub *et al.*, 2001). Les régions Switch I et II ne sont pas les seules régions impliquées dans la liaison des effecteurs. Il a été montré que la région « Insert » de Rac intervenait dans la liaison et l'activation de certains de ses effecteurs, la sous-unité p67^{PHOX} de la NADPH oxydase (Nicotinamide Adénine Dinucleotide Phosphate Hydrogen) (Nisimoto *et al.*, 1997) et d'IQGAP (IQ motif containing GAP homologue), mais pas dans celle de PAK (p21-activated kinase) (Freeman *et al.*, 1996). La liaison de RhoA à ses effecteurs fait aussi intervenir des résidus extérieurs aux régions Switch I et II (Fujisawa *et al.*, 1998).



2 - La région C-Terminale : un domaine de localisation membranaire

La majorité des Rho GTPases possède à leur extrémité C-terminale une séquence de modification post-traductionnelle : CAAX. Seules Chp, Miro et RhoBTB ne possèdent pas cette séquence (Tableau 2). Le résidu cystéine de cette séquence peut être modifiée par un groupement isoprénoïde en C₁₅ le Farnésyl (F) ou en C₂₀ le géranylgeranyl (GG), formant une « queue » lipidique (Ghomashchi *et al.*, 1995). Le tripeptide AAX est éliminé par protéolyse et l'extrémité C-terminale de la cystéine est ensuite carboxyméthylée (Clarke, 1992).

Il existe une autre région en amont de la séquence CAAX, impliquée dans la localisation membranaire des Rho GTPases, soit une région polybasique (très hydrophobe) comme dans Rac1 ou RhoA (Williams, 2003; Lanning *et al.*, 2004), soit une cystéine qui sera palmitoylée comme dans RhoB (Hancock, 1995). Les groupements isoprényles (F ou GG),

palmitoyl et la région polybasique renforcent les associations des Rho GTPases avec les membranes. Cette région est aussi une zone d'interaction majeure d'une classe de régulateurs des GTPases, les GDIs (*Figure 4C*).

C - La biologie des Rho GTPases : notion d'interrupteurs moléculaires

1 - Le cycle d'activation des GTPases

Les Rho GTPases sont des interrupteurs moléculaires dont la configuration alterne entre une forme active (GTP) et une forme inactive (GDP). La régulation de ce cycle se fait de façon très contrôlée. Les GEFs permettent l'échange du GDP avec du GTP, favorisant le passage de l'état inactif à l'état actif. Les GAPs, quant à elle augmentent l'activité GTPasique intrinsèque des GTPases favorisant le passage de l'état actif vers l'état inactif. Les signaux aboutissant à l'activation de ces régulateurs sont nombreux et variés et ont pour cibles aussi bien les GEFs que les GAPs. En dehors de ce cycle d'activation/inactivation les GTPases peuvent être régulées par des GDIs qui agissent à 2 niveaux, en réduisant l'interaction avec la membrane en masquant la « queue » lipidique, et en inhibant l'échange GDP/GTP (*Figure 3*).

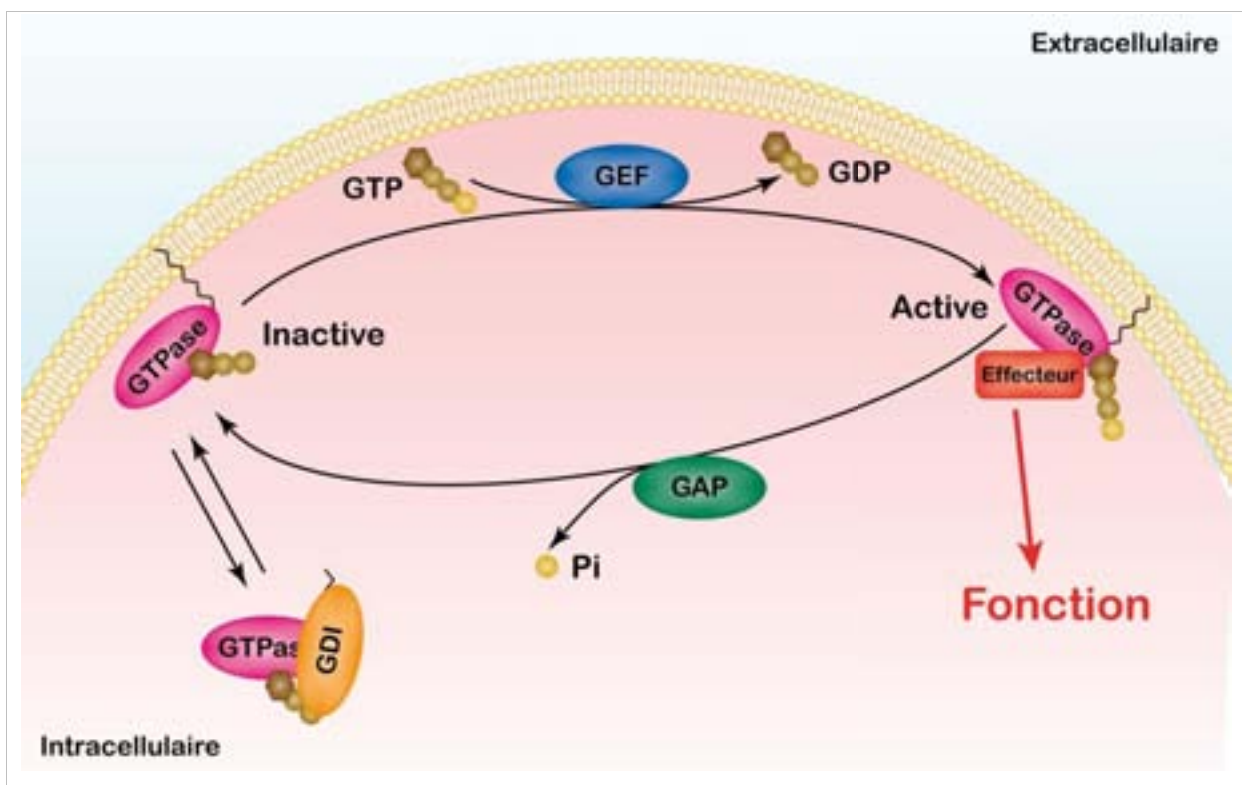


Figure 3 : le Cycle d'activation/désactivation des GTPases. Les GTPases existent sous 2 formes, une forme active liée au GTP et une forme inactive liée au GDP. Le passage de l'une à l'autre de ces formes est régulé par 2 classes de protéines. Les GEFs sont des protéines qui catalysent l'échange du GDP par le GTP, favorisant le passage vers la forme activée de la GTPase. Les GAPs sont des protéines qui augmentent l'activité GTPasique, favorisant la forme inactive de la GTPase. En outre, une autre classe de régulateur intervient en marge du cycle GDP/GTP, les GDIs, sont des protéines qui séquestrent les GTPases sous forme GDP dans le cytosol. L'activité de l'ensemble de ces protéines (GEFs, GAPs et GDIs) est régulée par divers signaux.

2 - Les régulateurs des Rho GTPases

Le nombre et la diversité des régulateurs des Rho GTPases (plus de 80 GEFs, autant de GAPs et 3 GDIs) montrent à quel point les Rho GTPases sont contrôlées de manière fine à toutes les étapes de leur cycle d'activation/inactivation.

a - Les GEFs

On connaît actuellement plus de 80 GEFs des Rho GTPases (ou Rho GEFs) qui sont réparties en 2 familles dont le mécanisme de fonctionnement est différent : la famille Dbl (Diffuse B-cell lymphoma), et la famille DOCK 180 (Dedicator of Cytokinesis 180).

• Les GEFs de la famille Dbl

Les protéines Dbl (plus de 70 membres) sont des protéines multidomaines très variées (Cerione & Zheng, 1996) telles que Tiam1 (T-cell lymphoma invasion and metastasis 1), Vav, Trio ou Pix (PAK-interacting exchange factor) (ten Klooster *et al.*, 2006). Les Rho GEFs de cette famille présentent une région d'environ 300 résidus formant un tandem structural composé d'un domaine DH (Dbl Homology) d'environ 200 résidus et d'un domaine PH (Plekstrin Homology ; détaillé page 33) d'une centaine de résidus (Hart *et al.*, 1991; Hart *et al.*, 1994) (*Figure 4B et Figure 12A*).

Ce tandem structural DH-PH possède, *in vitro*, une activité GEF supérieure au domaine DH seul ce qui montre un rôle du domaine PH dans l'activité GEF (Liu *et al.*, 1998; Rossman & Campbell, 2000). Le domaine DH qui est responsable de l'activité GEF, interagit principalement avec la région Switch II des Rho GTPases (Worthylake *et al.*, 2000; Aghazadeh *et al.*, 1998). Au niveau structural, le domaine DH est constitué d'une dizaine d'hélices α formant la zone d'interaction avec la GTPase (*Figure 4B*). Le rôle du domaine PH dans la biologie des GEF n'est pas totalement élucidé. On sait qu'il participe à la localisation membranaire des protéines Dbl par ses interactions avec les Phosphoinositides (Han *et al.*, 1998), mais il joue aussi un rôle dans l'activité GEF soit directement en interagissant avec la GTPase (Rossman *et al.*, 2002; Kristelly *et al.*, 2004), soit indirectement en favorisant l'intervention d'autres régulateurs tels que les Phosphoinositides (PI(4,5)P₂ et PI(3,4,5)P₃) (Das *et al.*, 2000; Russo *et al.*, 2001) ou des membres de la famille ERM (Ezrin Radixin Moesin) comme l'eitrine qui connecte le cytosquelette d'actine à la membrane plasmique (Vanni *et al.*, 2004). L'activité des GEFs peut être régulées par des processus impliquant d'autres parties de la protéine tels que des phosphorylations (Vav (Crespo *et al.*, 1997; Aghazadeh *et al.*, 2000), Tiam1 (Fleming *et al.*, 1999; Fleming *et al.*, 1997)) et/ou des changements de localisation subcellulaire (séquestration nucléaire pour Net1 (Schmidt & Hall, 2002), ou localisation

membranaire pour Tiam1 (Buchanan *et al.*, 2000; Michiels & Collard, 1999; Stam *et al.*, 1997).

La spécificité des GEFs est très variable, certaines sont spécifiques d'une GTPase, comme Tiam1 avec Rac1 (Michiels *et al.*, 1995) ou Intersectine avec Cdc42 (Hussain *et al.*, 2001) alors que d'autres sont capables d'interagir avec plusieurs GTPases, comme Dbs avec RhoA/Cdc42 (Cheng *et al.*, 2002) ou Vav avec RhoA/Rac1/Cdc42 (Bustelo, 2001) (*Tableau 3 ; Figure 4B*). La spécificité mesurée *in vitro* ne corrèle pas toujours avec celle observée *in vivo* (Vav2) (Heo *et al.*, 2005).

- Les GEFs de la famille DOCK 180

Les GEFs de la famille DOCK 180 (11 chez l'homme) ne possèdent pas de module DH-PH, le mécanisme de leur activité GEF fait intervenir un autre domaine : DHR2 (DOCK 180 Homology Region 2) (Cote & Vuori, 2002). Ce domaine d'environ 500 résidus, ne présente pas d'homologie de séquence avec le module DH-PH, mais montre une activité GEF (Meller *et al.*, 2002; Cote & Vuori, 2002; Brugnera *et al.*, 2002). Les protéines DOCK 180 présentent aussi un domaine DHR1 (DOCK 180 Homology Region 1) qui est un nouveau type de domaine d'interaction avec les Phosphoinositides $PI_{(3,4,5)}P_3$ (Cote *et al.*, 2005). Les Protéines de la famille DOCK 180 possèdent un domaine SH3 (Src Homology region 3) N-Terminal et certaines possèdent également un domaine PH.

Il a été montré que dans certaines situations, la protéine ELMO (Engulfment and cell motility) peut jouer un rôle dans l'activation de Rac1 par DOCK180 (Brugnera *et al.*, 2002; Grimsley *et al.*, 2004). Il existe au moins 3 mécanismes par lesquels ELMO module l'activité de Rac1. Premièrement, en stabilisant le complexe Rac1/DOCK 180 via son domaine PH (Lu *et al.*, 2004). Deuxièmement, en induisant un changement conformationnel de DOCK 180 par une interaction avec son domaine SH3 (Lu *et al.*, 2005). Enfin, troisièmement, en permettant à DOCK 180 d'être transloqué à la membrane plasmique, via des interactions entre ELMO et l'adaptateur p130^{CAS} (Zaidel-Bar *et al.*, 2005), RhoG (Katoh & Negishi, 2003) ou les protéines de la famille ERM (Grimsley *et al.*, 2006).

b - Les GAPs

On connaît à ce jour au moins 80 GAPs des Rho GTPases ou RhoGAPs (Bernards & Settleman, 2004). Ces protéines sont capables d'augmenter l'activité GTPasique, par ailleurs faible, des Rho GTPases. Elles interagissent principalement avec les régions Switch I et II. L'activité GAP est principalement due à un domaine conservé de 140 résidus, le domaine RhoGAP, qui diffère de celui des GAPs des autres petites GTPases (Ras, Ran et Arf), mais

dont la structure tertiaire est très proche (Zheng *et al.*, 1993). Tout comme les RhoGEFs, les RhoGAPs forment une famille très hétérogène (Figure 4D), dont les membres présentent de nombreux domaines d'interaction protéine-protéine (SH2 (Src Homology region 2), SH3, PR (Proline Rich Motif),...) et protéine-phospholipides (PH, C2 (Protein kinase C conserved region 2), BAR (Bin, Amphiphysin, Rvs)) (Bernards & Settleman, 2004).

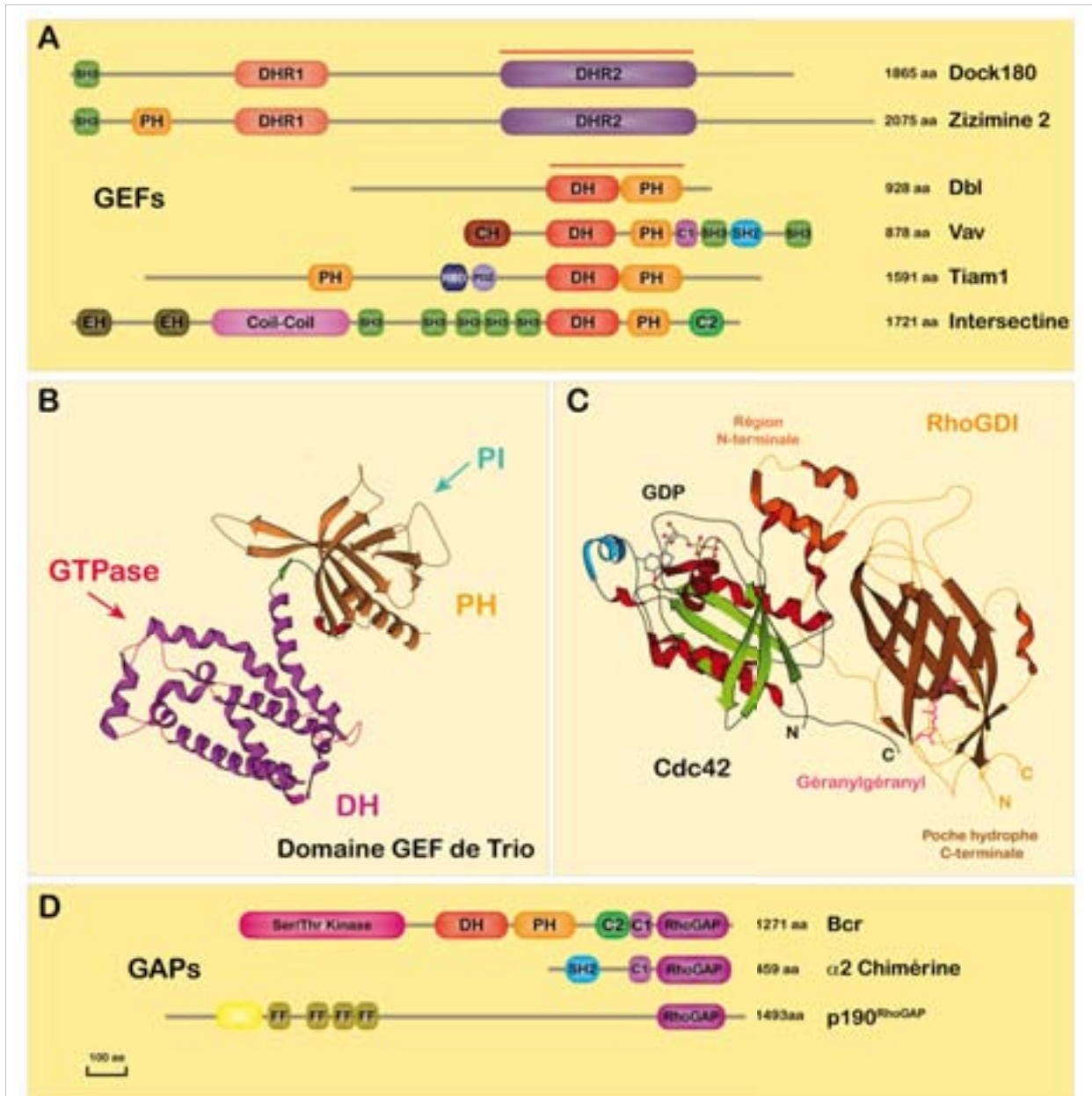


Figure 4 : Les régulateurs des Rho GTPases. (A) Représentation schématique des GEFs des familles DOCK 180 et Db1. (B) Structure tridimensionnelle du 1^{er} domaine DH-PH de Trio (PDB : 1NTY (Skowronek *et al.*, 2004)). (C) Structure tridimensionnelle de Cdc42 complexé avec RhoGDI (PDB : 1DOA (Hoffman *et al.*, 2000)). (D) Représentation schématique de quelques Rho GAPs. Abréviations : CH (Calponin Homology); C1 (Protein kinase C conserved region 1); C2 (Protein kinase C conserved region 2); DH (Db1 Homology); DHR1 (DOCK 180 Homology Region 1); DHR2 (DOCK 180 Homology Region 1); EH (Eps15-Homology); PDZ (PSD95/DlgA/ZO-1 domain); PH (Plekstrin Homology); RBD (Ras Binding Domain); SH2 (Src Homology 2); SH3 (Src Homology 3).

La structure du domaine GAP est, comme celle du domaine DH, une structure en hélice α qui possède dans une boucle un résidu arginine qui favorise l'hydrolyse du GTP (Scheffzek *et al.*, 1997; Resat *et al.*, 2001).

Du fait de leur hétérogénéité structurale, la régulation des Rho GAPs peut se faire par plusieurs mécanismes. L'activité GAP et la localisation cellulaire peuvent être régulée par phosphorylation (Minoshima *et al.*, 2003; Moskwa *et al.*, 2005), interaction avec des phospholipides (via certains phospholipides tels que PI(4,5)P₂ et l'acide phosphatidique ou via la structure de la membrane (les domaines BAR reconnaissent les courbures de la membrane), ou par dégradation protéique (Bernards & Settleman, 2004). La spécificité des RhoGAPs a été étudiée *in vitro*, et comme pour les GEFs, on trouve beaucoup de redondance dans ces spécificités (Moon & Zheng, 2003) (Tableau 3), mais la spécificité *in vivo* semble être beaucoup plus réduite (Sekimata *et al.*, 1999; Taylor *et al.*, 1999). Récemment, il a été montré que les phospholipides et les isoprénylations des GTPases peuvent avoir une incidence sur la spécificité des GAPs (Ligeti & Settleman, 2006).

		Cibles	Expression	Références
GEF				
Dbp	Bcr	RhoA, Rac1, Cdc42	Cerveau	(Voncken <i>et al.</i> , 1995)
	Vav1	RhoA, Rac1, Cdc42	Hématopoïétique	(Bustelo, 2000; Katzav <i>et al.</i> , 1995)
	Tiam1	Rac1	Ubiquitaire	(Collard <i>et al.</i> , 1996; Crompton <i>et al.</i> , 2000)
	Trio	Rac1	Ubiquitaire	(Bellanger <i>et al.</i> , 2000; Seipel <i>et al.</i> , 2001)
	Pix	Rac1	Ubiquitaire	(Baird <i>et al.</i> , 2006; Li <i>et al.</i> , 2003)
	Intersectine	Cdc42	Ubiquitaire	(Hussain <i>et al.</i> , 2001)
DOCK	DOCK 180	Rac1	Ubiquitaire	(Akakura <i>et al.</i> , 2004; Brugnera <i>et al.</i> , 2002; Cote & Vuori, 2002)
	Dock2	Rac1 ; Rac2	Hématopoïétique	
	Zizimine 1	Cdc42	Ubiquitaire	(Meller <i>et al.</i> , 2002)
	Zizimine 2	Cdc42	Hématopoïétique	(Nishikimi <i>et al.</i> , 2005)
GAP				
	Bcr	Rac1, Cdc42	Hématopoïétique	(Diekmann <i>et al.</i> , 1991; Chuang <i>et al.</i> , 1995)
	α1/α2 Chimérine	Rac1, Cdc42	Cerveau, Testicule	(Hall <i>et al.</i> , 2001)
	β1/β2 Chimérine	Rac1	Cerveau, Testicule	(Knetsch <i>et al.</i> , 2001)
	p85α, p85β	Rac1, Cdc42	Ubiquitaire	(Chamberlain <i>et al.</i> , 2004; Zheng <i>et al.</i> , 1994)
	p190 RhoGAP A	RhoA > Rac1, Cdc42	Ubiquitaire	(Gamblin & Smerdon, 1998; Ridley <i>et al.</i> , 1993)
	RhoGAP1	RhoA,	Ubiquitaire	(Prakash <i>et al.</i> , 2000a; Prakash <i>et al.</i> , 2000b)
GDI				
	RhoGDI α	RhoA, Rac1, Cdc42	Ubiquitaire	(Michaelson <i>et al.</i> , 2001)
	RhoGDI β	RhoA, Rac1, Cdc42	Hématopoïétique	(Gorvel <i>et al.</i> , 1998; Platko <i>et al.</i> , 1995)
	RhoGDI γ	RhoB, RhoG	Poumon, Cerveau, Testicule	(Zalcman <i>et al.</i> , 1996; Adra <i>et al.</i> , 1997)

Tableau 3 : Les régulateurs de l'activité des Rho GTPases.

c - Les GDIs

La dernière classe de régulateurs des Rho GTPases est la classe des RhoGDIs. On connaît actuellement 3 GDIs : RhoGDI α (Fukumoto *et al.*, 1990), RhoGDI β (LY-GDI) (Scherle *et al.*, 1993) et RhoGDI γ (Adra *et al.*, 1997). Les RhoGDIs sont des régulateurs négatifs de l'activation des Rho GTPases. Elles agissent à plusieurs niveaux. Tout d'abord en

bloquant l'échange GDP/GTP et l'activité GTPase, d'autre part en solubilisant les GTPases par masquage de la région C-Terminale isoprénylée et extraction membranaire de la forme GDP (DerMardirossian & Bokoch, 2005). Au niveau structural, les GDIs présentent 2 régions, une région N-terminale très flexible (résidus 1-69) et une région C-terminale (résidus 70-204) qui rendent compte de la dualité fonctionnelle des GDIs (Hoffman *et al.*, 2000). La région N-terminale est responsable de l'inhibition de la dissociation du GDP et de l'activité GTPase via des interactions avec les régions Switch I et II des Rho GTPases (Grizot *et al.*, 2001; Hoffman *et al.*, 2000). La région C-terminale forme une poche hydrophobe qui masque la « queue » isoprényl (F ou GG) de la GTPase (Hoffman *et al.*, 2000) (*Figure 4C*).

L'activité des GDIs peut être régulée par des phosphorylations qui peuvent stabiliser le complexe GTPase-GDI (Bourmeyster & Vignais, 1996) ou le déstabiliser (Mehta *et al.*, 2001; DerMardirossian *et al.*, 2004; Gorvel *et al.*, 1998). Le complexe GTPase-GDI peut aussi être déstabilisé par des interactions protéine-protéine avec des membres de la famille ERM (Takahashi *et al.*, 1997), la tyrosine kinase Etk (Epithelial and endothelial tyrosine kinase) (Kim *et al.*, 2002) ou le récepteur de la neurotrophine p75^{NTR} (Yamashita & Tohyama, 2003). Enfin, les lipides membranaires peuvent aussi intervenir en déstabilisant partiellement le complexe Rac1-RhoGDI α , cela a été montré *in vitro*, avec l'acide arachidonique, l'acide phosphatidique et le PI(4,5)P₂ (Chuang *et al.*, 1993; Faure *et al.*, 1999). De plus le PI(4,5)P₂, intervient aussi de manière indirecte, puisqu'il favorise l'interaction de RhoA avec les protéines de la famille ERM, en induisant des modifications conformationnelles de celles-ci (Yonemura *et al.*, 2002; Fievet *et al.*, 2004).

d - Les régulateurs exogènes des Rho GTPases

- Les toxines bactériennes

Certaines toxines bactériennes affectent la régulation de l'activité des GTPases et ont de ce fait été très utilisées dans les études fonctionnelles sur les GTPases. Ces toxines peuvent être classées en 2 catégories, celles qui modifient de manière covalente la GTPase, et celles qui se comportent comme des GEFs ou des GAPs. Le *Tableau 4* présente ces toxines leurs mode d'action et leur cible.

- Un inhibiteur synthétique

Par ailleurs, un inhibiteur synthétique de l'activation de Rac1 par la GEF spécifique Tiam1 a été élaboré par une approche rationnelle basée sur l'implication du résidu W⁵⁶ de Rac1 dans la spécificité de la GEF (*Tableau 5*). Tout d'abord sous la forme de peptides inhibiteurs (Gao *et al.*, 2001), puis en criblant une banque de composés chimiques afin

d'identifier un inhibiteur de Rac (Gao *et al.*, 2004). Ce composé inhibe l'activation de Rac induite par Trio et Tiam1, mais pas celle induite par Vav ou Intersectine (Gao *et al.*, 2004).

	Toxines	Origine	Mode d'action	Effet	Substrats	Références
Covalente	Exoenzymes de type C3					
	C3 Bot	<i>C. botulinum</i>	Ribosylation	inhibiteur	RhoA, RhoB, RhoC	(Aktories <i>et al.</i> , 2004)
	Toxines Clostridiales de grande taille					
	Toxine A, B	<i>C. difficile</i>	Glucosylation	inhibiteur	RhoA, Rac1, Cdc42	(Just <i>et al.</i> , 1995)
	Toxine B 1410	<i>C. difficile</i>		inhibiteur	Rac, (Cdc42)	(Chaves-Olarte <i>et al.</i> , 1999)
	Toxine Létale	<i>C. sordellii</i>		inhibiteur	Rac, (Cdc42)	(Popoff <i>et al.</i> , 1996)
	Facteurs Nécrosant Cytotoxiques (CNF)					
	CNF1	<i>E. coli</i>	Déamidation	activateur	Rho, Rac1, Cdc42	(Schmidt <i>et al.</i> , 1997)
	CNF2	<i>E. coli</i>		activateur	Rho, Rac1, Cdc42	(Flatau <i>et al.</i> , 1997)
	DNT	<i>B. spp</i>	Transglutamination	activateur	Rho, Rac1, Cdc42	(Horiguchi <i>et al.</i> , 1997)
GAP ou GEF	Toxines jouant le rôle de GAP					
	ExoS, ExoT	<i>P. aeruginosa</i>	GAP	inhibiteur	Rho, Rac1, Cdc42	(Krall <i>et al.</i> , 2002)
	SptP	<i>Salmonella</i>	GAP	inhibiteur	Cdc42	(Kaniga <i>et al.</i> , 1996)
	YopE	<i>Y. spp</i>	GAP	inhibiteur	Rho, Rac1, Cdc42	(Von Pawel-Rammingen <i>et al.</i> , 2000)
	Toxines jouant le rôle de GEF					
SopE, SopE2	<i>Salmonella</i>	GEF	activateur	Rho, Rac1, Cdc42	(Hardt <i>et al.</i> , 1998)	

Tableau 4 : Toxines bactériennes et Rho GTPases. (d'après (Aktories & Barbieri, 2005))

3 - Une multitude d'effecteurs

Nous avons vu précédemment quelles étaient les régions des Rho GTPases impliquées dans la reconnaissance des effecteurs (page 8). L'étude des effecteurs des différentes Rho GTPases a permis de mettre en évidence certains motifs impliqués dans la reconnaissance entre la Rho GTPase et son effecteur. Le motif CRIB (Cdc42/Rac Interactive Binding) est retrouvé dans les effecteurs de Rac et Cdc42, tels que PAK (Rac/Cdc42), N-WASP (Cdc42), ou encore ACK (Activated Cdc42-associated Kinase) (Cdc42). Il existe aussi des motifs spécifiques de la reconnaissance de Rho, le REM ou RBD I (Rho Binding Domain type I) de PKN (Protein Kinase Novel) (Maesaki *et al.*, 1999) et rhotekine et le RKH ou RBD II de ROCK (Bishop & Hall, 2000).

Les différentes études des Rho GTPases ont permis de mettre en évidence plus de 150 effecteurs qui placent ainsi les Rho GTPases au cœur de la plupart des grandes fonctions cellulaires (Bishop & Hall, 2000; Hall, 2005; Schwartz, 2004; Sahai *et al.*, 2001). Cette multitude d'effecteurs associée au nombre et à la diversité des régulateurs des Rho GTPases, font de la biologie des Rho GTPases un ensemble très complexe. Cette complexité est encore augmentée par les notions de convergence et de divergence des signaux médiés par les Rho GTPases. Ces notions ont été mises en évidence pour les signaux impliquant les familles Ras et Rho, mais le concept est aussi applicable entre les différentes Rho GTPases. La convergence est une situation dans laquelle 2 GTPases, sont activées par des GEFs

différentes, mais induisent des effets identiques. La régulation de la phosphorylation de la Cofiline est un bon exemple de convergence (page 20). Dans un mécanisme de divergence le pool de GEFS est commun mais les effecteurs et les effets sont différents (*Figure 6*).

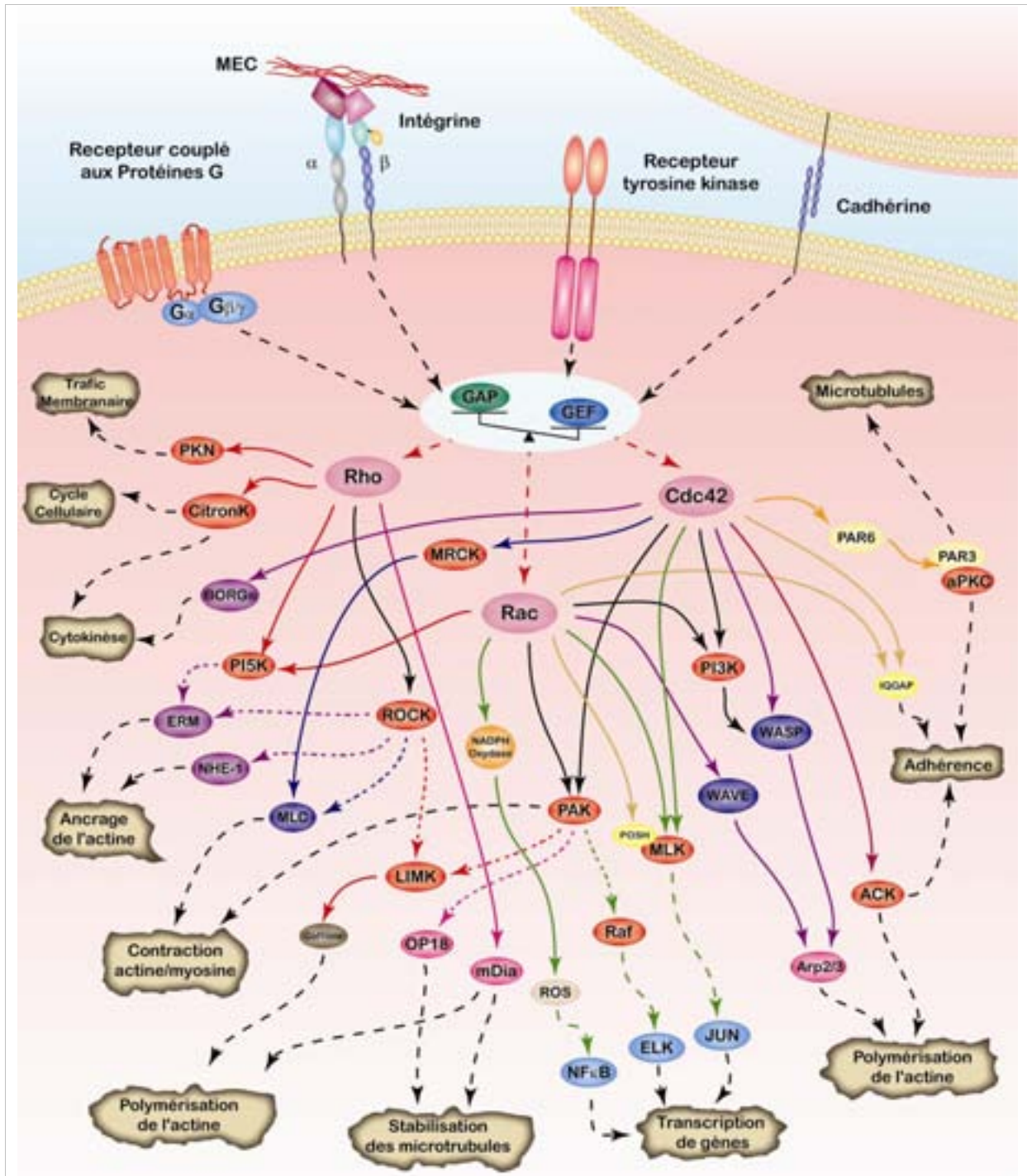


Figure 5 : Le réseau des effecteurs des Rho GTPases. Les signaux transmis par l'intermédiaire des interactions récepteur/ligand et des molécules d'adhérence stimulent ou inhibent le pool de GEFs et GAPs aboutissant à l'activation de l'une, l'autre ou plusieurs Rho GTPases. Cette représentation est un schéma partiel du réseau des effecteurs des Rho GTPases (d'après (Schwartz, 2004)). Abréviations : BORG (Binder of Rho GTPases); ERM (Ezrin Radixin Moesin); LIMK (LIM Kinase); MLC (Mysin Light Chain); mDia (murine Diaphanous formin 1); NHE-1 (Na/Hydrogen Exchange protein 1); PAK (p21 Activated Kinase); PKN (Protein Kinase Novel); ROCK (Rho Kinase); ROS (Reactive Oxygen Species).

4 - Le génie génétique a permis de développer de nombreux mutants

La GTPase Ras est mutée dans environ 30 % des tumeurs pancréatiques. Ces mutations affectent les positions 12, 13 et 61 et bloquent l'activité GTPasique de la protéine, induisant un blocage de la protéine sous forme liée au GTP, l'activation des voies de signalisation effectrices et l'émergence de son pouvoir oncogénique. Depuis leur découverte, les Rho GTPases ont été étudiées en générant des mutations aux positions analogues aux mutations oncogéniques de Ras. Ces mutations confèrent également un potentiel oncogénique aux Rho GTPases. Des mutants de deuxième génération, dans lesquels l'interaction avec certains effecteurs est perdue, ont également été décrits et ont permis de disséquer les voies de signalisation propres à chaque GTPase (Lamarche *et al.*, 1996). Le *Tableau 5* présente les principales mutations des Rho GTPases. Comme nous allons le voir dans le paragraphe suivant, l'étude des propriétés de ces mutants a permis de montrer que les Rho GTPases sont au cœur de nombreuses fonctions cellulaires grâce à leur nombreux effecteurs. Contrairement à Ras, les Rho GTPases sont rarement mutées dans les tumeurs mais peuvent être surexprimées (RhoC).

	Résidus			GTPase	Effets	Références
	Muté	N°	Original			
CA	V	12	G	Rac1; Cdc42	Perte d'activité GTPase intrinsèque et GAP dépendante	(Ridley & Hall, 1992b; Ridley & Hall, 1992a)
	V	14	G	RhoA		
	L	61	Q	Rac1; Cdc42		
	L	63	Q	RhoA		
	F	28	L	Cdc42	« Fast Cycling » échange rapide GDP/GTP (GEF independent)	(Lin <i>et al.</i> , 1997)
DN	N	17	S	Rac1; Cdc42	Perte d'affinité pour GTP : forme GDP prédominante	(Feig, 1999; Ridley & Hall, 1992a)
	N	19	S	RhoA		
GEF	F	56	W	Rac1	↓ spécificité pour Tiam1, Trio ↑ spécificité pour Intersectine	(Karnoub <i>et al.</i> , 2001; Gao <i>et al.</i> , 2001)
	W	56	F	Cdc42	↑ spécificité pour Tiam1, Trio ↓ spécificité pour Intersectine	
Effecteurs	C	40	Y	Rac1/Cdc42	Perte de liaison à PAK, mais pas à p67 ^{PHOX}	(Westwick <i>et al.</i> , 1997)
	K	40	Y	Rac1/Cdc42		
	H	40	Y	Rac1/Cdc42		
	A	37	F	Rac1/Cdc42		
	L	37	F	Rac1/Cdc42	Perte de liaison à p67 ^{PHOX} , mais pas à PAK	(Joneson <i>et al.</i> , 1996)
Loc	S	189	C	Rac1/Cdc42	Perte du signal d'isoprénnylation	(del Pozo <i>et al.</i> , 2000; Kreck <i>et al.</i> , 1994)

Tableau 5 : Mutations des Rho GTPases. CA : Constitutivement actif ; DN : Dominant Négatif ; Loc : Défaut de localisation.

II - Les fonctions des Rho GTPases

A - Les Rho GTPases et le cytosquelette : de la forme au mouvement

1 - Généralités : le cytosquelette

La capacité des cellules eucaryotes à maintenir ou changer leur forme, souvent associée à leur fonction, dépend en grande partie du cytosquelette. Le cytosquelette est un réseau complexe de fibres intracellulaires qui parcourt le cytosol. Il permet le maintien de la structure de la cellule ou sa déformation (lors de la migration cellulaire ou de la mitose), l'adhérence aux cellules voisines ou à la matrice extracellulaire, la polarisation cellulaire (répartition des organites et transport vésiculaire). Ce réseau est composé de 3 grandes familles de filaments protéiques: les microtubules, les filaments intermédiaires et les filaments fins (*Tableau 6*). Tous ces filaments sont des polymères fibrillaires insolubles, résultant de l'assemblage de protéines monomériques.

Type de filaments	Structure	Dynamique	Fonctions
Filaments fins	Hélice de 7 nm de diamètre formée de 2 chaînes d'actine F	oui	Contractilité cellulaire et tissulaire (liaison aux protéines motrices) Plasticité membranaire (ruffles, pseudopodes, microvillosités,...) Sillon de division cellulaire Maintien des jonctions cellulaires Forme cellulaire Protection contre les agressions physiques
Microtubules	Tube de 25 nm de diamètre formé de 13 protofilaments de Tubuline	oui	Structure des cils et flagelles Mouvements des organites et des chromosomes Forme et polarité cellulaire
Filaments intermédiaires	Superhélice de protéines fibreuses de 8 à 12 nm de diamètre	non	Maintien des jonctions cellulaires Forme cellulaire Soutien de l'enveloppe nucléaire Protection contre les agressions physiques

Tableau 6 : Les composants principaux du cytosquelette.

Les filaments fins, sont des polymères d'actine. Ils participent à la plasticité membranaire, aux déformations/protrusions membranaires ou la motilité cellulaire. La formation de ces filaments est un processus complexe, polarisé et dynamique en 3 étapes majeures : l'initiation (nucléation), l'élongation et la stabilisation (Pollard *et al.*, 2000). Les filaments d'actine présentent une extrémité (+) dite « barbelée » (barbed) avec une vitesse de polymérisation rapide et une extrémité (-) dite pointue (pointed) avec une vitesse de polymérisation lente. La biologie du cytosquelette d'actine fait intervenir de nombreuses protéines qui jouent un rôle dans la formation et la stabilisation de ces filaments. Parmi les protéines impliquées dans la formation des filaments d'actine, on trouve la profiline qui est une protéine qui séquestre l'actine dans le cytosol et permet son chargement en ATP, étape

indispensable pour la polymérisation des filaments d'actine (Pollard *et al.*, 2000). La stabilisation des filaments d'actine fait intervenir des protéines de « coiffage » qui se fixent à une des extrémités et empêchent la polymérisation ou la dépolymérisation. Certaines de ces protéines de « coiffage » se fixent sur l'extrémité (+) comme la gelsoline ou CapZ, et certaines sur l'extrémité (-) comme la tropomoduline (Revenu *et al.*, 2004). Ces mécanismes sont très finement contrôlés par de nombreuses molécules dont les Rho GTPases.

De manière similaire, les microtubules sont des polymères dynamiques formés de dimères de tubuline. Ils possèdent une extrémité (-) (souvent localisée au niveau du COMT (Centre Organisateur de Microtubule) et une extrémité (+) (à la périphérie) (Desai & Mitchison, 1997). Les microtubules interviennent dans la polarisation de la cellule, et dans la séparation des chromatides dans la mitose. Les Rho GTPases interviennent à différents niveaux dans l'organisation et la dynamique de ces structures.

Les filaments intermédiaires diffèrent des filaments fins et des microtubules, car ils sont très stables et ne présentent pas de dynamique comme les 2 autres, leur rôle est principalement structural. Les principaux composants des filaments intermédiaires sont les kératines, la vimentine et les lamines.

2 - La régulation structurelle du cytosquelette

a - L'organisation du cytosquelette d'Actine

Une des fonctions les plus étudiées des Rho GTPases est la régulation du cytosquelette d'actine (Ridley & Hall, 1992b; Ridley & Hall, 1992a). Dans les études réalisées sur les fibroblastes, il a été montré que l'activation des 3 principales Rho GTPases induit des modifications du cytosquelette d'actine. L'activation de Cdc42 induit la formation de long prolongements cytoplasmiques fins, les filopodes (Ridley & Hall, 1992a), celle de Rac1 des protrusions cytoplasmiques larges appelées lamellipodes (Ridley *et al.*, 1992; Ridley & Hall, 1992b) et des ondulations membranaires appelées « ruffles » et enfin celle de RhoA, des fibres contractiles d'actine/myosine appelées fibres de stress ou fibres de tension, ainsi que des points d'ancrage de celles-ci à la membrane, les plaques d'adhérence focales (Ridley & Hall, 1992b; Nobes & Hall, 1995) (*Figure 6*).

Les acteurs majeurs de la nucléation et de l'élongation des filaments d'Actine sont le complexe Arp2/3 (Actin-related protein 2/3) (Millard *et al.*, 2004) et les formines. Rac1 et Cdc42 activent toutes les 2 le complexe Arp2/3 qui intervient dans la nucléation de filaments branchés sur des filaments préexistants. Cdc42 active Arp2/3 via au moins 2 effecteurs N-WASP (Neural Wiskott-Aldrich Syndrome Protein) (Rohatgi *et al.*, 1999) et Toca-1 (Transducer of

Cdc42-dependent actin assembly) (Ho *et al.*, 2004). Rac1 induit l'activation du complexe Arp2/3 via les protéines WAVE (WASP family Verprolin-homologous) (Takenawa & Miki, 2001; Suetsugu *et al.*, 2006) et/ou 2 autres effecteurs potentiels Nap125 et PIR121 (Eden *et al.*, 2002). RhoA intervient dans les phases de nucléation et d'élongation des filaments d'actine en activant son effecteur mDia1 (murine Diaphanous formin 1) (Zigmond, 2004) (*Figure 6C*).

Les Rho GTPases interviennent aussi au niveau de la stabilisation des filaments d'actine en induisant l'inhibition par phosphorylation de la cofiline, une protéine impliquée dans la dépolymérisation de l'actine à l'extrémité (-) (Bamburg, 1999). La kinase responsable de cette inhibition, la LIMK (Lin11, Isl1, Mec3 Kinase), peut être activée par ROCK (Rho dependent Kinase) (Ohashi *et al.*, 2000) et/ou PAK (Rac/Cdc42) (Edwards *et al.*, 1999) (*Figure 6C*).

Les GTPases RhoA et Rac1 interviennent dans l'organisation du cytosquelette d'actine en induisant la génération localisée de PI(4,5)P₂ (Phosphoinositide-4,5-DiPhosphate) au niveau de la membrane plasmique via leur effecteur PIP5K (Phosphoinositide-4-Phosphate 5 Kinase) qui est une lipide kinase (la biologie des phosphoinositides sera développée dans *Section II* (page 30)). Ces lipides membranaires favorisent la polymérisation de l'actine en inactivant les protéines de coiffage telles que la cofiline (Ojala *et al.*, 2001; Schafer *et al.*, 1996), la gelsoline (Liepina *et al.*, 2003) ou des protéines séquestrante comme la profiline (Wittenmayer *et al.*, 2004).

Les Rho GTPases jouent aussi un rôle dans l'organisation et la contraction de fibres actine/myosine, en contrôlant la phosphorylation de la MLC (Myosin Light Chain). En effet, la forme phosphorylée de la MLC induit la formation de fibre actine/myosine et la contraction de celles-ci. Rho induit cette phosphorylation via son effecteur ROCK qui phosphoryle directement la MLC (Kawano *et al.*, 1999) et inhibe la MLCP (MLC Phosphatase) (Amano *et al.*, 1996). Cdc42 peut aussi induire la phosphorylation de la MLC via son effecteur MRCK (Myotonic dystrophy kinase-Related Cdc42 binding Kinase) (Leung *et al.*, 1998), mais Rac et Cdc42 sont surtout impliquées dans l'inhibition de cette phosphorylation en inhibant la MLCK (MLC Kinase) (Sanders *et al.*, 1999) (*Figure 6B*).

Les Rho GTPases RhoA et Cdc42 interviennent dans la formation de structures d'adhérence particulières impliquant le cytosquelette d'actine, les podosomes, que nous développeront dans le Chapitre 3 (page 149). Dans certains modèles une forme constitutivement active de Cdc42 induit la formation de podosomes (les cellules épithéliales (Dutartre *et al.*, 1996), les mastocytes (Castellano *et al.*, 2001) ou les cellules endothéliales (Moreau *et al.*, 2003)), alors que dans d'autre elle l'inhibe (cellules dendritiques (Burns *et al.*, 2001)). Le même type de résultats ont été obtenus avec une forme constitutivement active de

RhoA qui induit la formation (Chellaiah *et al.*, 2000) ou la dissociation (Ory *et al.*, 2000) des podosomes dans les ostéoclastes selon le modèle utilisé. Cependant, dans les 2 modèles, l'inhibition de RhoA empêche la formation des podosomes (Chellaiah *et al.*, 2000; Ory *et al.*, 2000).

b - Les microtubules

Les Rho GTPases interviennent de différentes manières dans la formation et le maintien des microtubules. Rac et Cdc42 peuvent stabiliser l'extrémité (+) des microtubules via PAK qui inhibe la protéine Op18/stathmine impliquée dans la dépolymérisation et le désassemblage des microtubules (Cassimeris, 2002). RhoA et Cdc42 peuvent aussi stabiliser les microtubules en favorisant le complexe EB1/APC (End-Binding protein 1/Adenomatous Polyposis Coli), via leur effecteurs respectifs mDia (Wen *et al.*, 2004) et PAR6 (Etienne-Manneville & Hall, 2003). Dans un autre contexte, RhoA peut inhiber la polymérisation des dimères de Tubuline à l'extrémité (+), via une inhibition de la CRMP-2 (Collapsin Response Mediator Protein 2) par ROCK (Fukata *et al.*, 2002b; Arimura *et al.*, 2000) (*Figure 6D*).

c - La morphogénèse des cellules

Dans certaines situations, les cellules ont besoin d'établir une polarisation, dans les divisions cellulaires orientées, la différenciation de certains types cellulaires (cellules épithéliales, neurones) ou encore la migration orientée. Ces polarisations induisent une distribution asymétrique de récepteurs, molécules d'adhérence, protéines du cytosquelette et même des organites intracellulaires. Cdc42 joue un rôle important dans ces phénomènes de polarisations, principalement via son effecteur PAR6 qui forme un complexe avec PAR3 et aPKC (atypical Protein Kinase C). Ce complexe est impliqué dans de nombreux processus nécessaires à la polarisation des cellules (Chen *et al.*, 2006; Suzuki & Ohno, 2006) comme la régulation de la polymérisation des microtubules. Rac aussi semble jouer un rôle mais pour l'instant celui-ci reste obscur (Yu *et al.*, 2005; Zhang & Macara, 2006; Cau & Hall, 2005). Cdc42 intervient dans la polarisation des microtubules à un autre niveau en favorisant la capture des microtubules au niveau des filaments d'actine dans les régions corticales de la cellule via son effecteur IQGAP. IQGAP est une protéine de scaffolding qui interagit avec les filaments d'actine et CLIP170 (Cytoplasmic Linker Protein 170) une protéine de liaison des microtubules (Fukata *et al.*, 2002a).

L'établissement de jonctions cellule-cellule est un processus important dans la mise place de la polarité cellulaire des cellules épithéliales. Ces jonctions, appelées jonctions adhérentes, sont assurées par des interactions homophiliques entre des cadhérines (page 70). Au niveau intracellulaire, ces jonctions représentent des points de recrutement de filaments

d'actine grâce aux caténines. Rac et Cdc42 stabilisent ces jonctions via leur effecteur IQGAP. IQGAP séquestre les caténines, l'activation de Rac et Cdc42 en interagissant avec IQGAP qui libère les caténines les rendant disponibles pour les cadhérines (Kuroda *et al.*, 1999; Noritake *et al.*, 2004) (Figure 6A).

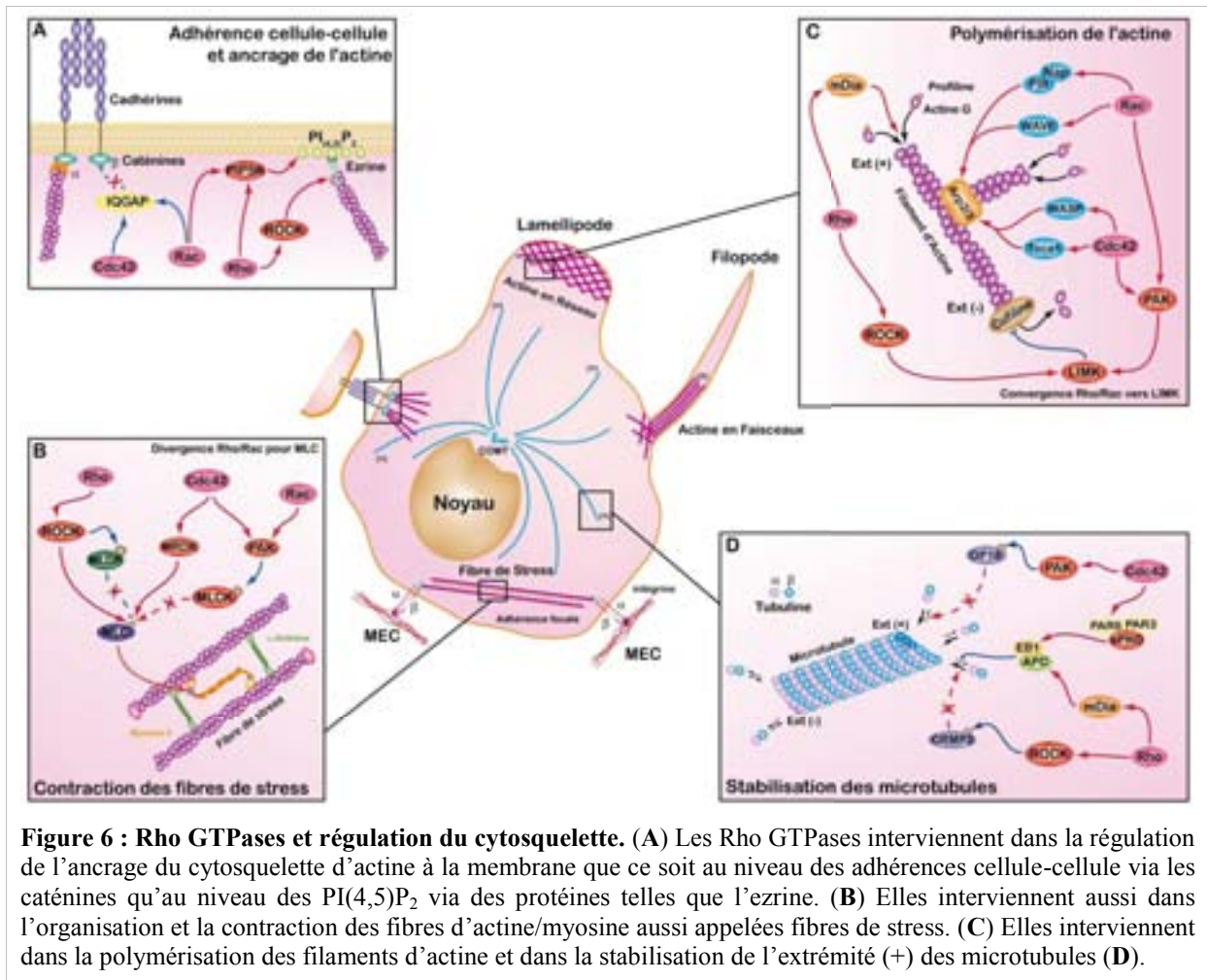


Figure 6 : Rho GTPases et régulation du cytosquelette. (A) Les Rho GTPases interviennent dans la régulation de l'ancrage du cytosquelette d'actine à la membrane que ce soit au niveau des adhérences cellule-cellule via les caténines qu'au niveau des PI(4,5)P₂ via des protéines telles que l'eitrine. (B) Elles interviennent aussi dans l'organisation et la contraction des fibres d'actine/myosine aussi appelées fibres de stress. (C) Elles interviennent dans la polymérisation des filaments d'actine et dans la stabilisation de l'extrémité (+) des microtubules (D).

Les Rho GTPases permettent aussi la connexion du cytosquelette d'actine à la membrane par l'intermédiaire de leur effecteur PIP5K (Matsui *et al.*, 1999). La génération localisée de PI(4,5)P₂ permet le recrutement et l'activation de protéines de pontage actine-membrane telles que les protéines ERM (Fievet *et al.*, 2004; Hamada *et al.*, 2000), la vinculine (Niggli, 2001; DeMali *et al.*, 2002) ou la taline (Martel *et al.*, 2001; Garcia-Alvarez *et al.*, 2003) (Figure 6A).

d - Le trafic membranaire

Les Rho GTPases interviennent dans les mécanismes de phagocytose de types I et II (Caron & Hall, 1998). La phagocytose de type I fait intervenir les récepteurs des fragments Fc des immunoglobulines (FcR). Ce type de phagocytose implique Cdc42 et Rac (Massol *et al.*, 1998), via leurs effecteurs PAK (Dharmawardhane *et al.*, 1999) et WASP/WAVE (May *et al.*, 2000) qui induisent la réorganisation du cytosquelette nécessaire à la phagocytose. Rac1 intervient aussi en activant la PIP5K I α qui induit la production locale de PI(4,5)P₂ nécessaire à la régulation des filaments d'actine (Botelho *et al.*, 2000; Tolia *et al.*, 2000). La phagocytose de type II est liée au récepteur du complément C3bR et implique RhoA via son effecteur ROCK et son effet sur la MLC (Olazabal *et al.*, 2002).

Les Rho GTPases interviennent aussi dans l'endocytose dépendante ou non de la Clathrine. L'endocytose clathrine-indépendante est le mécanisme d'internalisation prépondérant des récepteurs ancrés par le GPI (Glycosyl Phosphatidyl Inositol) qui dépend de Cdc42, mais pas de Rac1 (Sabharanjak *et al.*, 2002). L'endocytose clathrine dépendante fait principalement intervenir RhoA et Rac1. Rac1 joue ici un rôle central en contrôlant la production de PI(4,5)P₂ via ses effecteurs PIP5K I (Tolia *et al.*, 1995; Tolia *et al.*, 2000; Barbieri *et al.*, 2001) et synaptojanine 2 qui est une PI 5-Phosphatase (Malecz *et al.*, 2000).

3 - La régulation du mouvement : la migration

La migration cellulaire est un processus essentiel dans les organismes pluricellulaires, lors du développement, mais aussi lors de la réponse immunitaire et la réparation tissulaire. La migration est un phénomène orienté induit soit à distance, soit localement par des facteurs solubles. La première étape de la migration est une polarisation de la cellule (déterminant un axe antéro-postérieur) que ce soit au niveau du cytosquelette, de l'appareil de sécrétion aussi bien qu'au niveau de la répartition des lipides membranaires (Ridley *et al.*, 2003). Cette polarisation est principalement sous le contrôle de Cdc42 comme nous l'avons vu au paragraphe précédent.

Le modèle actuellement admis pour décrire la migration cellulaire orientée est basé sur un cycle protrusion/rétractation aboutissant au déplacement de la cellule. Une fois orientée la cellule développe des protrusions cytoplasmiques (lamellipodes ou filopodes) au front de migration. Ces protrusions sont issues de la polymérisation de filaments d'actine et stabilisées par la formation d'adhérence cellule-matrice extracellulaire. Ces sites d'adhérence servent de point de traction pour la cellule en mouvement. Parallèlement, à l'arrière de la cellule, la contraction des filaments d'actine/myosine et la déstabilisation des adhérences aboutissent à la rétractation de la cellule (Ridley *et al.*, 2003).

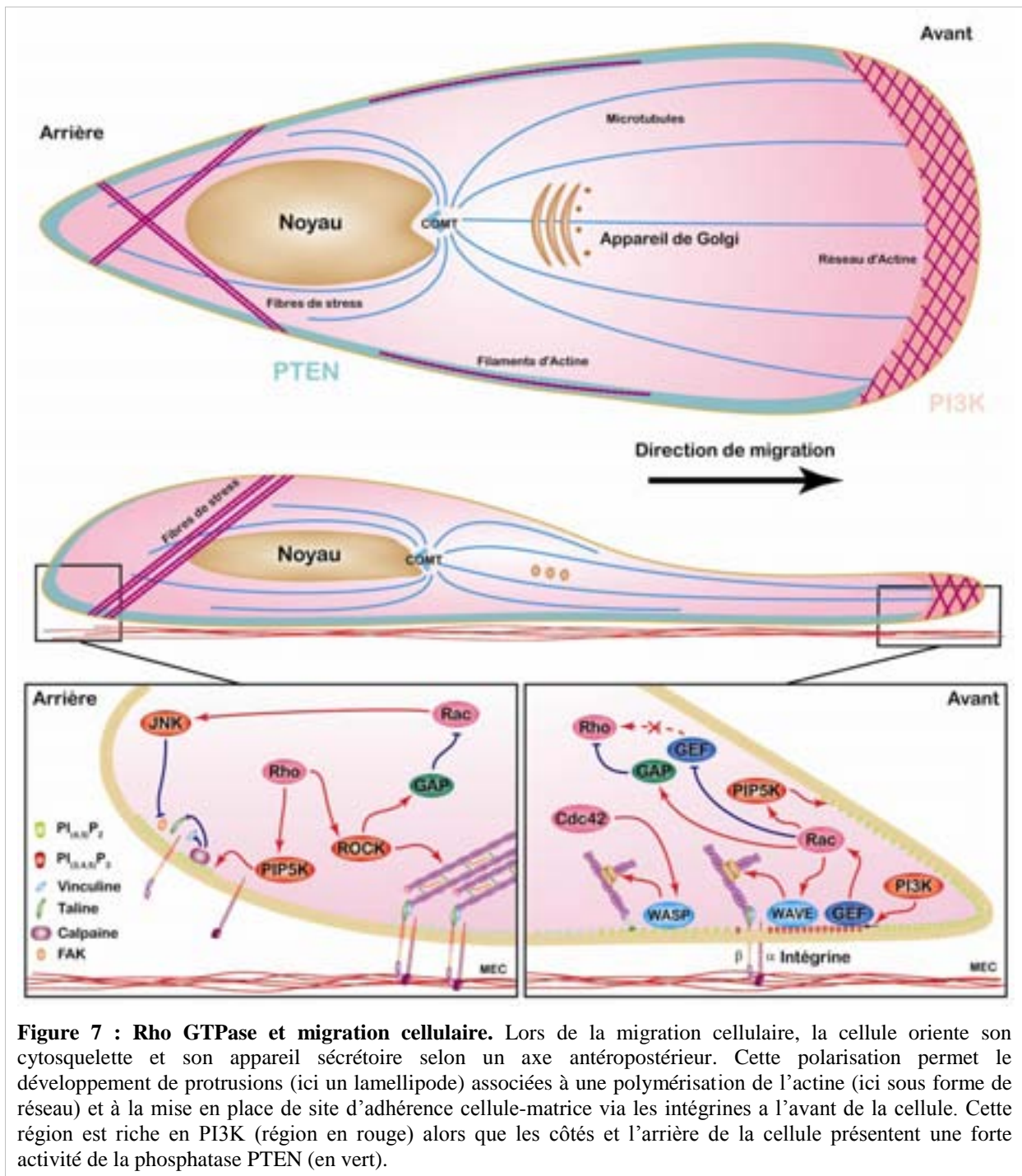


Figure 7 : Rho GTPase et migration cellulaire. Lors de la migration cellulaire, la cellule oriente son cytosquelette et son appareil sécrétoire selon un axe antéropostérieur. Cette polarisation permet le développement de protrusions (ici un lamellipode) associées à une polymérisation de l'actine (ici sous forme de réseau) et à la mise en place de site d'adhérence cellule-matrice via les intégrines à l'avant de la cellule. Cette région est riche en PI3K (région en rouge) alors que les côtés et l'arrière de la cellule présentent une forte activité de la phosphatase PTEN (en vert).

Le mouvement de la cellule proprement dit nécessite à « l'avant » une polymérisation de l'actine, assurée par la voie Rac-WAVE-Arp2/3 au niveau du front de migration grâce à la génération locale de $PI(4,5)P_2$ via les PIP5K et d'un gradient de $PI(3,4,5)P_3$ entretenu localement par la PI3K à l'avant (Gardiner *et al.*, 2002; Itoh *et al.*, 2002; Kraynov *et al.*, 2000) et par la phosphatase PTEN sur les côtés et à l'arrière de la cellule (Li *et al.*, 2003; Merlot & Firtel, 2003). Cdc42 et Rac1 joue un rôle actif dans l'élaboration de ce gradient (Srinivasan *et al.*, 2003; Servant *et al.*, 2000; Golub & Caroni, 2005). Dans le modèle actuel, RhoA intervient à l'« arrière » de la cellule, en induisant la phosphorylation de la MLC via

ROCK, entraînant la contraction des fibres actine/myosine (Riento & Ridley, 2003). Il semble pourtant que dans certains cas, la migration ne nécessite pas ROCK (Sahai & Marshall, 2003), ou même que l'inhibition de ROCK stimule la migration (Nobes & Hall, 1999).

Dans ce modèle on retrouve un antagonisme RhoA/Rac1 que l'on peut schématiser par une activation de Rac à l'« avant » de la cellule et une activation de RhoA à l'arrière. Cet antagonisme est entretenu par des régulations croisées de GAP et de GEF spécifiques de ces 2 Rho GTPases. Ainsi, il a été montré que Rac inhibe localement l'activité de RhoA en activant la GAP, p190 RhoGAP (Nimnual *et al.*, 2003) et en inhibant la GEF Net1 (Wen *et al.*, 2004). Récemment, il a été montré qu'une protéine de liaison à l'actine, la filamine A, pouvait se lier à une GAP de Rac, FilGAP, activée par l'effecteur de RhoA, ROCK (Ohta *et al.*, 2006). Dans ce dernier cas il a été montré que dans une cellule en migration l'activité de FilGAP était finement régulée par ROCK à l'« arrière » et sur les côtés de la cellule en migration (Ohta *et al.*, 2006) (*Figure 7*).

Parallèlement à la réorganisation du cytosquelette d'actine la migration nécessite la mise en place de structure d'adhérence forte à l'« avant » et le désassemblage de celles-ci à l'arrière. Rac joue un rôle dans ces processus via l'activation de la voie JNK-paxilline qui induit un recyclage des FAKs (Focal Adhesion Kinase) à l'« arrière » (Huang *et al.*, 2003a).

B - Les Rho GTPases, la croissance et survie cellulaire

1 - Les Rho GTPases et la régulation de l'expression de gènes

Les Rho GTPases régulent plusieurs voies de signalisation impliquées dans l'expression des gènes. Récemment, une étude a montré que la surexpression de formes actives de RhoA, Rac1 et Cdc42 régule l'expression de près de 1190 gènes (Teramoto *et al.*, 2003).

a - Régulation par la voie Actine/MAL

Le promoteur de nombreux gènes, dont ceux codant pour les protéines du cytosquelette, contient un élément SRE (Serum Response Element) qui répond à plusieurs facteurs de transcription. L'un d'entre eux, le SRF (Serum Response Factor) est régulé par RhoA, Rac1 et Cdc42 (Hill *et al.*, 1995). Ce facteur de transcription nécessite un cofacteur, MAL (Megakaryocytic Acute Leukemia), qui est lié à l'actine. Lors d'une stimulation, la polymérisation de l'actine libère MAL qui est alors transporté vers le noyau où il permet l'activation de SRF (Miralles *et al.*, 2003). Ce mécanisme est dépendant de RhoA via la voie ROCK-LIMK et mDia, mais les mécanismes mis en jeu ne sont pas encore élucidés.

b - Régulation par les voies de MAPKs

Les 3 Rho GTPases sont capables d'activer plusieurs facteurs de transcription tels que ATF1, ATF2, c-Jun, Elk1 ou SAp1 par l'intermédiaires des MAPKs (Mitogen Activated Protein Kinase) telles que p38 et JNK (c-Jun N-Terminale Kinase). Parmi les effecteurs des Rho GTPases on trouve plusieurs MAP3K (MAP Kinase Kinase Kinase) : MEKK4 (MAP/ERK Kinase Kinase 4) est un effecteur de Rac et Cdc42 et MEKK1 un effecteur de RhoA (Gallagher *et al.*, 2004) et Rac/Cdc42 (Burbelo *et al.*, 1995; Chen & Cobb, 2006). On trouve aussi plusieurs MLK (Mixed-Lineage Kinase) impliquées dans l'activation de JNK: MLK2, MLK3 (Teramoto *et al.*, 1996; Zhang & Gallo, 2001). Enfin, plusieurs effecteurs des Rho GTPases sont des adaptateurs qui font le lien entre les MAPK et les GTPases. Par exemple, l'adaptateur POSH (Plenty of SH3) est impliqué dans l'activation de JNK par Rac1 via MLK3 (Tapon *et al.*, 1998; Xu & Greene, 2006).

c - Régulation par la voie des STATs

Les Rho GTPases modulent aussi l'activité d'une autre famille de facteur de transcription, les STATs (Signal Transducer and Activator of Transcription). L'activité transcriptionnelle de STAT3, mais pas celle de STAT1 est modulée par RhoA via une phosphorylation sur Tyrosine (Aznar *et al.*, 2001). D'autres études ont montré que Rac1 peut activer STAT3, via phosphorylation sur sérine dépendante (Turkson *et al.*, 1999) ou non (Schuringa *et al.*, 2001) de JNK et p38. Les Rho GTPases peuvent aussi activer un autre membre de la famille STAT, STAT5a (mais pas STAT5b). RhoA induit la phosphorylation de STAT5a en Y⁶⁹⁶ via JAK2 (Janus Kinase 2), et en S⁷²⁶ et S⁷⁸⁰ via un mécanisme indépendant de JNK1, MAK1 et p38 (Benitah *et al.*, 2003).

d - Régulation par la voie NFκB

Les Rho GTPases peuvent aussi réguler le facteur de transcription NFκB dans différents contextes. RhoA, Cdc42 et Rac1 induisent l'activité de NFκB (p50/p65) via la phosphorylation et la dégradation de son inhibiteur IκBα et la translocation des dimères p50/p50 et p50/p65 vers le noyau (Perona *et al.*, 1997). Cdc42 induit l'activation de NFκB via JNK (Montaner *et al.*, 1998) et Rac1 via JNK avec (Sulciner *et al.*, 1996) ou sans production de ROS (Reactive Oxygen Species) via la NADPH Oxydase (p67^{PHOX}) (Hayakawa *et al.*, 2003). RhoA fait intervenir ROCK qui active IκB kinase qui induit la dégradation de IκBα (Anwar *et al.*, 2004), mais aussi rhotekine (Liu *et al.*, 2004) et peut être PKN (Gotoh *et al.*, 2004).

2 - Le cycle cellulaire et la croissance

Le cycle de division cellulaire (« cycle cellulaire ») est composé de 4 phases : G₁, S, G₂, M, dont le contrôle est effectué par les protéines kinases CDKs (Cyclin Dependant Kinase), sous le contrôle de leurs sous-unités régulatrices, les cyclines et de leurs inhibiteurs les CDKIs (Cyclin Dependant Kinase Inhibitor). On distingue principalement 2 types de signaux impliqués dans la progression du cycle cellulaire, ceux liés aux facteurs de croissance et ceux dus au phénomène d'adhérence.

a - La progression G₁/S

Le rôle des Rho GTPases dans la progression de la phase G₁ du cycle cellulaire a été mis en évidence dès le début des années 90 (Yamamoto *et al.*, 1993; Olson *et al.*, 1995). La progression G₁/S est sous le contrôle de 2 types de CDKs : CDK 2 et CDK 4/6 activées par les cyclines D et E et inhibées par INK4A et p21^{CIP}/p27^{KIP} respectivement (Lee & Yang, 2003). Les Rho GTPases interviennent de différentes manières dans le contrôle de ces molécules.

Tout d'abord au niveau des CDKIs, on sait que RhoA réprime p21^{CIP}, que ce soit par séquestration dans le cytosol via la voie ROCK (Zuckerbraun *et al.*, 2003; Lai *et al.*, 2002; Coleman *et al.*, 2006), ou par régulation de la transcription (Sahai *et al.*, 2001). Ces effets de RhoA sur p21^{CIP} semblent constituer un point de contrôle décisif dépendant de l'adhérence dans la progression G₁/S. Rac1 et Cdc42 réprime aussi p21^{CIP} en induisant sa dégradation (Bao *et al.*, 2002). RhoA intervient aussi dans répression de la traduction de l'ARNm de p27^{KIP} (Vidal *et al.*, 2002).

Pendant la phase G₁, le taux de cycline D est maintenu constant grâce à une activation prolongée des MAPKs. Cette activation prolongée fait intervenir des signaux issus des récepteurs de facteurs de croissance et des molécules d'adhérence. Dans les fibroblastes, RhoA joue un rôle dans l'expression de la cycline D dépendante de l'adhérence, via la voie ROCK-LIMK, et cela sans rapport avec les substrats « habituels » de la LIMK (Roovers & Assoian, 2003; Roovers *et al.*, 2003) et en inhibant l'expression précoce de cycline D induite par Rac1 et Cdc42 (Welsh *et al.*, 2001) via NFκB (Westwick *et al.*, 1997; Joyce *et al.*, 1999). Dans les cellules endothéliales, l'augmentation de la traduction de la cycline D induite par Rac1 semble être un mécanisme majeur de contrôle de la progression G₁/S (Mettouchi *et al.*, 2001). Par ailleurs, Cdc42 augmente la transcription de l'ARNm de la cycline E en fin de phase G₁ via la p56^{S6K}, permettant le passage vers la phase S (Chou *et al.*, 2003).

b - La mitose

Lors de la mitose, les Rho GTPases interviennent à plusieurs niveaux. La voie RhoA-ROCK-MLC intervient dans l'alignement des centrosomes nécessaire à la mise en place du fuseau mitotique (Rosenblatt *et al.*, 2004). Cdc42 intervient dans la mise en place de l'association entre les microtubules du fuseau mitotiques et les chromosomes via leurs kinetochores, ce mécanisme fait intervenir l'effecteur mDia3 (Yasuda *et al.*, 2004; Narumiya *et al.*, 2004). Cdc42 intervient aussi dans les divisions asymétriques via PAR6 (Gotta *et al.*, 2001; Peterson *et al.*, 2004; Etienne-Manneville & Hall, 2001). Enfin, RhoA intervient dans la cytokinèse en induisant la contraction de l'anneau contractile. Au moins 3 effecteurs de RhoA interviennent dans cette fonction, mDia (Kato *et al.*, 2001), ROCK (Yamashiro *et al.*, 2003) et CITRON Kinase (Gruneberg *et al.*, 2006; Komatsu *et al.*, 2000). Cdc42 intervient dans la cytokinèse en contrôlant les septines par l'intermédiaire des BORGs (Binder Of Rho GTPases) (Joberty *et al.*, 1999; Joberty *et al.*, 2001).

3 - Rho GTPases et survie

Les Rho GTPases sont impliqués dans de nombreux processus anti-apoptotiques. RhoA protège de l'apoptose induite par p53 dans le développement des cellules T (Costello *et al.*, 2000). Rac1 protège de l'apoptose en induisant la production de ROS par la NAPDH Oxydase (Joneson & Bar-Sagi, 1999; Pervaiz *et al.*, 2001), l'inhibition de la protéine pro-apoptotique Bad (Tang *et al.*, 2000; Schurmann *et al.*, 2000) et de la voie JAK/STAT1 via PAK (Loucks *et al.*, 2006). On sait aussi que Rac2 induit l'activation de la kinase Akt dans les mastocytes (Yang *et al.*, 2000).

RhoB quant à elle est impliquée dans l'apoptose induites par les agents causants des dommages à l'ADN (Liu *et al.*, 2001a) ou les inhibiteurs de Farnésyltransférases (Prendergast, 2001). Rac1 intervient aussi dans l'induction de l'apoptose par Fas (Brenner *et al.*, 1997; Subauste *et al.*, 2000).

Section II : Les phosphoinositides et les phosphoinositides 3-Kinases

I - Les phosphoinositides

A - Généralités

Les phosphoinositides (PIPs) sont des dérivés phosphorylés d'un lipide membranaire le phosphatidylinositol (PI). Leur relative faible abondance au sein des membranes cellulaires montre qu'ils ne jouent pas là un rôle structural fondamental (Overduin *et al.*, 2001). Leur localisation et leur métabolisme très finement contrôlés en font des seconds messagers lipidiques essentiels dans le contrôle de nombreuses fonctions cellulaires telles que la régulation du cytosquelette d'actine (Kanzaki *et al.*, 2004; Takenawa & Itoh, 2001), le trafic vésiculaire (Di Paolo *et al.*, 2004; Huang *et al.*, 2004), le transport du glucose (Lin *et al.*, 2005; Sbrissa *et al.*, 2004), la régulation de l'apoptose (Albi & Viola Magni, 2004; Mejillano *et al.*, 2001), de la prolifération ou la migration cellulaire (Zini *et al.*, 2005; Snoek, 2004) (Tableau 7).

B - Biologie des phosphoinositides

1 - Structure et métabolisme

Le PI est un glycérophospholipide membranaire qui représente environ 10% de l'ensemble des lipides cellulaires (Rameh & Cantley, 1999). Il est constitué d'un cycle inositol (en C₆) branché en position 1 à un diacylglycérol (DAG) par une liaison phosphodiester impliquant le 3^{ème} groupement hydroxyle de celui-ci. Le DAG contient généralement un acide stéarique (C₁₈ saturé) sur le premier groupement hydroxyle et un acide arachidonique (C₂₀ polyinsaturé) sur le 2^{ème} (Figure 8A). Il constitue la région membranaire du PI. Le noyau inositol, est quant à lui orienté vers le cytosol, et possède 5 groupements OH libres dont 3 peuvent être phosphorylés (positions 3,4 et 5) donnant naissance à 7 formes différentes de PIPs : 3 monophosphorylées (PI(3)P, PI(4)P, PI(5)P), 3 biphosphorylées (PI(3,4)P₂, PI(4,5)P₂, PI(3,5)P₂) et 1 triphosphorylée (PI(3,4,5)P₃). Les formes les plus abondantes des PIPs, les PI(4)P et PI(4,5)P₂, ne représentent que 0,5% de l'ensemble des lipides membranaires et les formes les moins abondantes, les PI(3,4)P₂ et PI(3,4,5)P₃ ne représentent que 0,25% des PIPs (Rameh & Cantley, 1999). Malgré cette faible abondance les PIPs jouent des rôles essentiels.

Le métabolisme des PIPs est complexe et la formation, le recyclage et la répartition cellulaire de ces PIPs sont hautement régulés par un ensemble de kinases et de phosphatases (Vanhaesebroeck *et al.*, 2001; Martin, 1998; Varnai & Balla, 2006) (Figure 8 ; Tableau 7).

Lipides	Domaines protéiques	Fonctions	Références
PI		Précurseur des PIPs	
PI(4)P	PH ; ENTH/ANTH	Précurseur des PIPs Interaction avec la taline	(Godi <i>et al.</i> , 2004; Heraud <i>et al.</i> , 1998)
PI(3)P	PX ; FYVE	Trafic vésiculaire Endocytose	(Gillooly <i>et al.</i> , 2001)
PI(5)P	PX	Cytosquelette d'actine Apoptose	(Albi & Viola Magni, 2004; Sbrissa <i>et al.</i> , 2004; Gozani <i>et al.</i> , 2003)
PI(4,5)P ₂	PH ; PX ; ENTH/ANTH ; FERM ; C2	Substrat des PLCs (formation de DAG et IP ₃)	(Berridge, 1984; Rhee & Bae, 1997)
		Précurseur de PI(3,4,5)P ₃ (PI3K)	(Vanhaesebroeck <i>et al.</i> , 2001)
		Endocytose, Cytosquelette d'actine	(Kanzaki <i>et al.</i> , 2004; Botelho <i>et al.</i> , 2000; Doughman <i>et al.</i> , 2003)
PI(3,5)P ₂	PH	Trafic vésiculaire	(Cooke <i>et al.</i> , 1998; Yamamoto <i>et al.</i> , 1995)
PI(3,4)P ₂	PH	Prolifération, Survie Cytosquelette d'actine	(Janmey <i>et al.</i> , 1999)
PI(3,4,5)P ₃	PH ; PX ; SH2	Prolifération, Survie Cytosquelette d'actine	(Janmey <i>et al.</i> , 1999)

Tableau 7 : Les Phosphoinositides, leurs localisations et leurs fonctions.

2 - Le PI(4,5)P₂ : un rôle central dans la biologie des phosphoinositides

a - Synthèse et régulation

Le PI(4,5)P₂ joue un rôle central dans la biologie des PIPs. C'est la forme la plus abondante, agissant au carrefour de plusieurs voies de signalisation majeures. 2 voies de synthèse des PI(4,5)P₂ ont été décrites. Dans la première, dite « classique », le précurseur des PI(4,5)P₂ est le PI(4)P produit à partir du PI (Toker, 1998) et dans la seconde il s'agit du PI(5)P (Rameh *et al.*, 1997b).

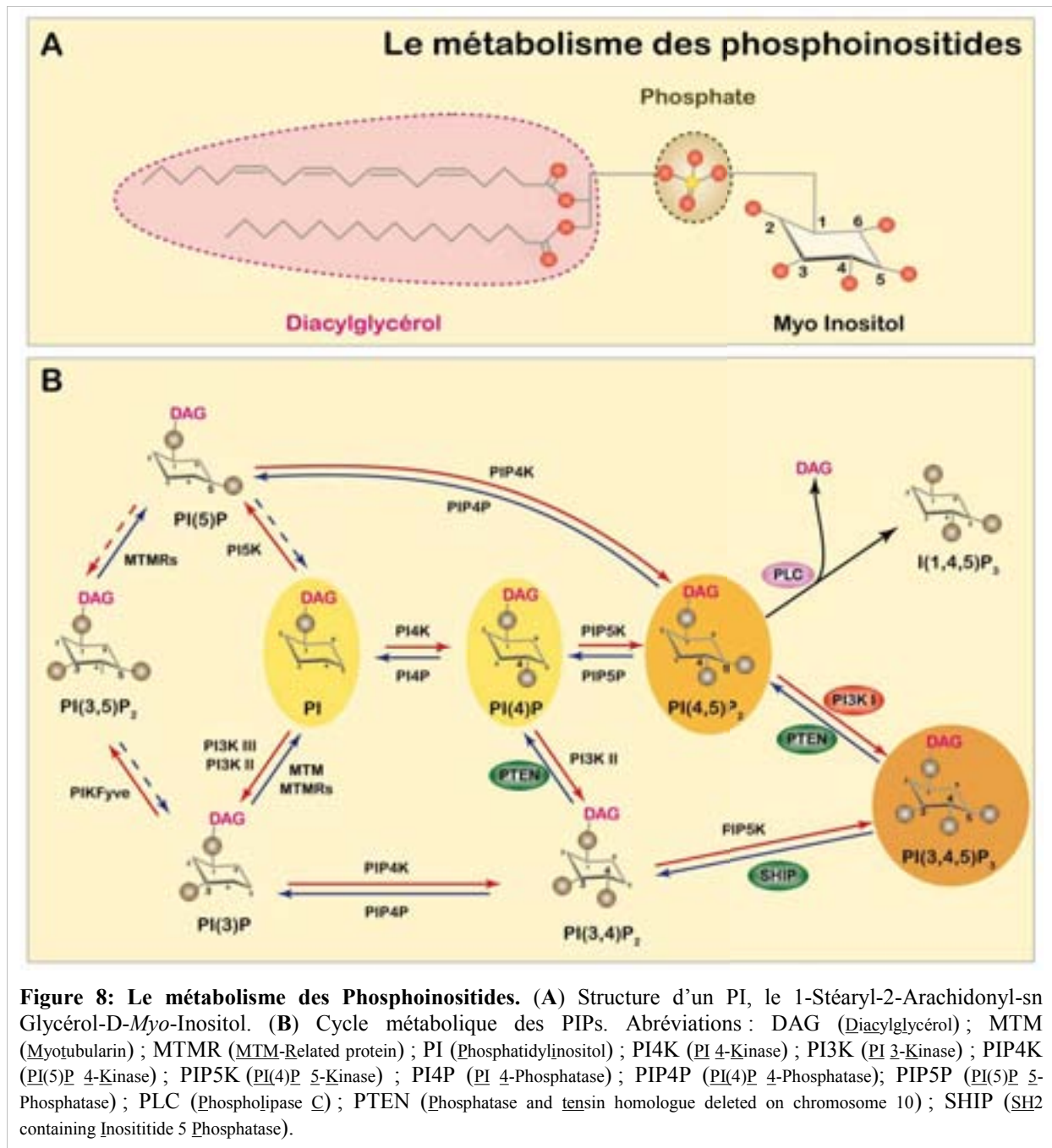
Dans des cellules au repos, il existe un cycle permanent de phosphorylation/déphosphorylation du PI(4)P et du PI(4,5)P₂, permettant le maintien d'un pool basal faible mais constant de PI(4,5)P₂ (Michell, 1975).

b - PI(4,5)P₂ et transduction du signal : 2 voies principales

Le PI(4,5)P₂ est au centre de plusieurs voies de signalisation. Tout d'abord, le PI(4,5)P₂ est le substrat préférentiel des PLCs (Phospholipases C) qui clivent la molécule en DAG et I(1,4,5)P₃ (Inositol Trisphosphate) qui sont des seconds messagers dans l'activation des PKC (Protéine Kinase C) et la régulation du taux de Ca²⁺ intracellulaire respectivement (Berridge, 1984; Rhee & Bae, 1997; Berridge, 1989).

Parallèlement à cette voie le PI(4,5)P₂ peut être phosphorylé en position 3 par les PI 3-Kinases (PI3K) générant du PI(3,4,5)P₃. Le PI(3,4,5)P₃ joue un rôle dans de nombreuses fonctions cellulaires en servant de molécule de recrutement pour de nombreuses protéines

contenant des domaines d'interactions de type domaine PH. Cette voie sera très largement exposée dans les paragraphes suivants.



3 - Les domaines d'interaction protéine-PIPs rendent compte des fonctions des PIPs

a - Les domaines d'interaction avec les PIPs

La régulation très fine du métabolisme des PIPs, induit une répartition très contrôlée de ceux-ci dans les membranes intracellulaires. Cette répartition permet aux PIPs d'intervenir

dans de nombreux processus, via le recrutement de protéines possédant des domaines d'interaction spécifiques d'une forme ou l'autre de PIPs. C'est la spécificité de ces domaines qui rend compte des rôles des PIPs dans la cellule. On peut classer ces domaines en 2 grandes familles les domaines spécifiques des PIPs et les domaines à spectre plus large (Santagata *et al.*, 2001; Balla, 2005). Parmi ces domaines, on trouve les domaines PH, PX (Phox domain), FYVE (Fab-1, YGL023, Vps27 and EEA1), ENTH (Epsin N-Terminal Homology), Tubby et C2.

Domaines	Interactions		Protéines	Références	
	Lipides	Protéines			
PIP spécifiques	ENTH	PI(4,5)P ₂	epsine 1 ; CALM	(Itoh <i>et al.</i> , 2001; De Camilli <i>et al.</i> , 2002)	
	FYVE	PI(3)P	EEA1	(Burd & Emr, 1998; Patki <i>et al.</i> , 1998)	
	PH	PI(4,5)P ₂	oui	PLCδ	(Lemmon <i>et al.</i> , 1995)
		PI(3,4)P ₂		Akt ; TAPP1	(Dowler <i>et al.</i> , 2000; Rameh <i>et al.</i> , 1997a; Scheid <i>et al.</i> , 2002a)
		PI(3,5)P ₂		centaurine β2	(Dowler <i>et al.</i> , 2000)
		PI(3,4,5)P ₃		Btk ; ARNO ; Akt ; PDK1	(James <i>et al.</i> , 1996; Scheid <i>et al.</i> , 2002a; Salim <i>et al.</i> , 1996; Cozier <i>et al.</i> , 2004)
	PX	PI(3)P		P40 ^{PHOX}	(Ellson <i>et al.</i> , 2001; Kanai <i>et al.</i> , 2001; Zhan <i>et al.</i> , 2002)
		PI(3,4)P ₂		P47 ^{PHOX}	(Karathanassis <i>et al.</i> , 2002; Zhan <i>et al.</i> , 2002)
		PI(3,4,5)P ₃		CISK	(Xing <i>et al.</i> , 2004; Xu <i>et al.</i> , 2001)
		PI(4,5)P ₂		PI3K C2γ	(Song <i>et al.</i> , 2001)
FERM	PI(4,5)P ₂	oui	ezrine, moesine	(Chishti <i>et al.</i> , 1998; Hamada <i>et al.</i> , 2000)	
PHD	PI(5)P	oui	ING2	(Gozani <i>et al.</i> , 2003; Pendaries <i>et al.</i> , 2006)	
Non Spécifiques	C2	PS ; PIP	PTEN (Ca ²⁺ -indépendant)	(Lee <i>et al.</i> , 1999; Das <i>et al.</i> , 2003)	
		PS ; PIP	PI3K II (Ca ²⁺ -indépendant)	(Arcaro <i>et al.</i> , 1998)	
		PI(4,5)P ₂ PI(3,4,5)P ₃	synaptotagmine I (Ca ²⁺ dépendent)	(Mehrotra <i>et al.</i> , 2000; Shao <i>et al.</i> , 1997)	
	SH2	PI(3,4,5)P ₃	oui	p85 (PI3K Iα) PLCγ	(Rameh <i>et al.</i> , 1995) (Rameh <i>et al.</i> , 1998; Bae <i>et al.</i> , 1998)
	Tubby	PI(4,5)P ₂ PI(3,4)P ₂		Tubby	(Santagata <i>et al.</i> , 2001)
MARKCS	PS PI(4,5)P ₂		MARKS	(Zhang <i>et al.</i> , 2003)	

Tableau 8 : Les domaines d'interaction avec les PIPs.

b - Le domaine PH

Le domaine PH est une séquence d'une centaine d'acides aminés découverts à l'origine dans la pleckstrine, un substrat des PKCs dans les plaquettes (Tyers *et al.*, 1988) comme étant le premier domaine d'interaction avec les PIPs (Harlan *et al.*, 1994). Les domaines PH sont présents dans des protéines kinases (Akt, Btk), des GEFs (famille Dbl), des GAPs, et des Phospholipases (Cozier *et al.*, 2004). Les domaines PH peuvent reconnaître les PI(4,5)P₂, PI(4)P, PI(3,4,5)P₃ et PI(3,4)P₂ avec plus ou moins d'affinité et de spécificité en fonction de

leur séquence primaire (Lemmon & Ferguson, 2000; DiNitto *et al.*, 2003). Par exemple, le domaine PH de la PLC δ reconnaît le PI(4,5)P₂ avec une haute sélectivité, alors que celui de PDK1 (PI Dependent Kinase 1) reconnaît le PI(3,4,5)P₃ et celui d'Akt reconnaît PI(3,4,5)P₃ et PI(3,4)P₂. Les différents domaines PH ne présentent que peu d'homologie au niveau de leur séquence primaire, mais ils montrent une remarquable conservation dans leur structure secondaire. Les domaines PH forment un « baril β » composé de 7 feuillets β antiparallèles perpendiculaires, et d'une hélice α C-terminale. La surface de liaison entre le domaine PH et les PIPs contient principalement des résidus des boucles β 1/ β 2, β 3/ β 4, et β 6/ β 7 (*Figure 4B* (page 13) et (*Figure 12A* (page 49)). Les résidus basiques de la boucle β 1/ β 2 sont particulièrement importants pour lier les PIPs, en formant une surface chargée positivement (Blomberg *et al.*, 1999). Depuis quelques années, d'autres éléments ont montré que les domaines PH peuvent aussi jouer des rôles dans les interactions protéines-protéines (Lemmon, 2005; Lemmon & Ferguson, 2000). Plus particulièrement avec les Rho GTPases : RhoA et CNK1 (Jaffe *et al.*, 2004), RhoA et Etk (Kim *et al.*, 2002), Rac et PLC β 2 (Snyder *et al.*, 2003) et leur régulateurs tels que le GEFs (Rossman *et al.*, 2002; Lu *et al.*, 2004).

c - Le domaine C2

Les domaines C2 ne sont pas des domaines de liaison spécifique des PIPs, mais ils jouent un rôle important dans un certain nombre de molécules intervenant dans leur métabolisme (PI kinase et PI phosphatase). Le domaine C2 est une séquence de 80 à 160 résidus possédant une capacité de liaison au phospholipides Ca²⁺-dépendante et/ou Ca²⁺-indépendante (Vanhaesebroeck *et al.*, 2001). Ce type de domaine à été mis en évidence dans les PKCs (Nishizuka, 1988). Les domaines C2 ont une spécificité large, ils reconnaissent la plupart des phospholipides anioniques (PIP_s, phosphatidylsérine) (Rizo & Sudhof, 1998). Certains domaines C2 sont dépourvus des résidus impliqués dans la fixation du Ca²⁺ et sont plus particulièrement impliqués dans des mécanismes Ca²⁺-indépendant, par exemple le domaine C2 C-terminal des PI3Ks de classe II et celui de PTEN.

II - Les Phosphoinositides 3-Kinase : PI3Ks

A - Généralités

Parmi les PI kinases qui régulent le métabolisme des PIPs, la famille des kinases catalysant le transfert d'un groupement phosphate en position 3 du cycle inositol, les PI 3-Kinases (PI3Ks), est une famille très importante (*Figure 8*). Les PI3Ks peuvent phosphoryler le PI, le PI(4)P et le PI(4,5)P₂ respectivement en PI(3)P, PI(3,4)P₂ et PI(3,4,5)P₃. Depuis sa découverte au début des années 90, l'activité PI3K et ses produits ont été impliqués dans

diverses fonctions cellulaires telles que la régulation du taux de Ca^{2+} intracellulaire ou la survie cellulaire, dont un des nombreux aspects sera détaillé dans la *Section III* avec la biologie de la kinase Akt. Les membres de la famille des PI3Ks sont répartis en trois classes sur la base de leurs substrats spécifiques, leur structure et leur mécanisme de régulation (Domin & Waterfield, 1997) (*Figure 9*).

B - Les 3 classes de PI3Ks

1 - Les sous-unités catalytiques

Il existe 8 sous-unités catalytiques possédant une activité PI3K. Ces 8 protéines partagent des régions d'homologies (numérotées de l'extrémité C vers N-terminale), la région HR1 (Homology Region 1) représente le domaine catalytique, la région HR2 ou PIK (PI Kinase homology) de fonction mal connue, la région HR3 qui est un domaine C2 et la région HR4 qui est un RBD (Ras Binding Domain) (Walker *et al.*, 1999). Les variations de ce schéma de base seront décrites comme des spécificités de chaque classe.

2 - Les PI3Ks de classe I

Les PI3Ks de classe I sont des hétérodimères constituées d'une sous-unité régulatrice de 50 à 90 kDa et d'une sous-unité catalytique de 110 kDa. Elles sont capables de phosphoryler les PI, PI(4)P et PI(4,5)P₂ en position 3 du noyau inositol, *in vitro* et préférentiellement le PI(4,5)P₂ *in vivo* (Hawkins *et al.*, 1992; Stephens *et al.*, 1991). On en distingue 2 sous-classes en fonction de la nature de leurs différentes sous-unités et de leur mode d'activation. La classe I_A est associée aux tyrosines phosphorylées (via des adaptateurs) et à la GTPase Ras, et la classe I_B aux protéines G hétérotrimériques.

a - La classe I_A

Les sous unités catalytiques des PI3Ks de classe I_A sont aux nombres de 3 codées par 3 gènes : *Pik3ca* qui code pour p110 α , *Pik3cb* qui code pour p110 β et *Pik3cd* qui code pour p110 δ (hématopoïétique) (Vanhaesebroeck *et al.*, 2001). Ces 3 isoformes contiennent à leur extrémité N-terminale un domaine de liaison à la sous unité régulatrice.

La caractéristique de cette sous-classe réside dans les sous-unités régulatrices associées qui possèdent des domaines SH2 (Src Homology 2) reconnaissant des motifs phosphorylés sur Tyrosine (Y(P)xxM). On connaît 5 isoformes majeures de la sous-unité régulatrice des PI3Ks de classe IA codées par 3 gènes, *Pik3r1* code pour p85 α , p55 α et p50 α , *Pik3r2* code pour p85 β et *Pik3r3* code pour p55 γ (cerveau et testicule). Toutes ces isoformes partagent une région C-terminale formées par 2 domaines SH2 encadrant une région dites inter-SH2 (iSH2) qui est la zone d'interaction entre la sous-unité régulatrice et la p110 (Dhand *et al.*, 1994;

Klippel *et al.*, 1993). Les différences entre ces 5 isoformes se retrouvent donc dans la région N-terminale, qui contient pour les 2 p85 (α et β), un domaine SH3 et un domaine BH (Bcr Homology) homologue d'un domaine RhoGAP encadré par 2 régions PR (Prolin Rich) (Otsu *et al.*, 1991). Le domaine BH fera l'objet d'un autre paragraphe. Les isoformes p55 α et p50 α issues d'épissage alternatifs du gène *Pik3r1* et p55 γ ne possèdent qu'une région PR précédée par une séquence de 34, 6 ou 34 résidus respectivement (Okkenhaug & Vanhaesebroeck, 2001) (*Figure 9A*).

b - La classe I_B

On ne connaît qu'une seule PI3K de classe I_B. Elle est formée de la sous-unité catalytique p110 γ et de la sous-unité régulatrice p101. La sous-unité régulatrice de la PI3K I_B, p101 est codée par le gène *Pik3r5*. Elle ne possède aucune homologie avec les sous-unités régulatrice de la classe I_A, et possède un domaine de liaison aux récepteurs couplés aux protéines G hétérotrimériques (Vanhaesebroeck *et al.*, 2001) (*Figure 9B*).

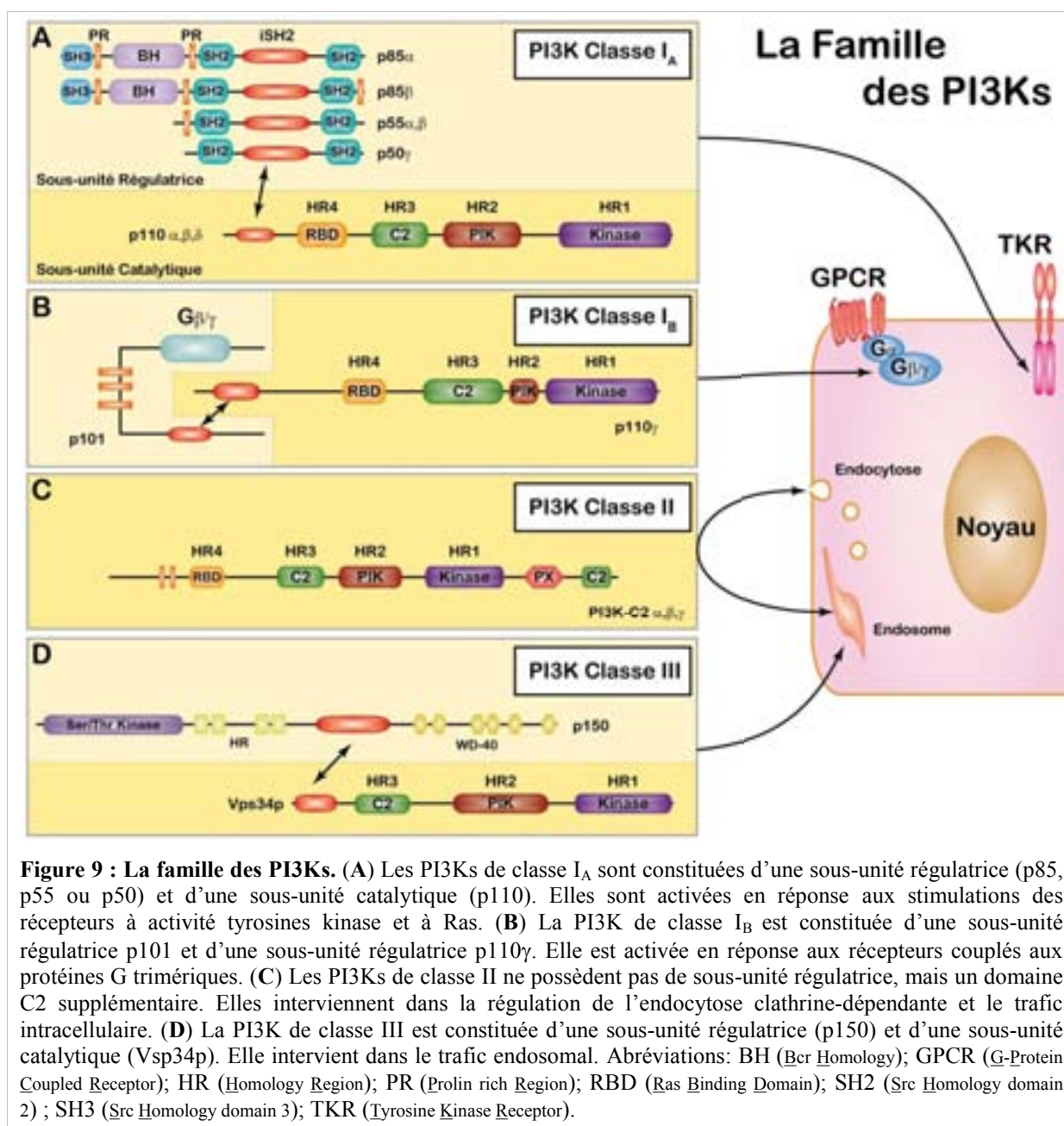
3 - Les PI3Ks de classe II

Contrairement aux PI3Ks de classe I et III les PI3K de classe II sont des monomères d'environ 170 kDa : les PI3K-C2. On en connaît 3 isoformes PI3K-C2 α , PI3K-C2 β qui sont ubiquitaires et PI3K-C2 γ qui est principalement exprimée dans le foie (Vanhaesebroeck *et al.*, 2001). Cette famille de PI3Ks est caractérisée par un domaine C2 supplémentaire en C-Terminal qui reconnaît les phospholipides de manière indépendante du Ca²⁺ (Arcaro *et al.*, 1998) et un domaine PX. Leurs substrats préférentiels, *in vitro*, sont le PI et le PI(4)P mais pas le PI(4,5)P₂ (Domin *et al.*, 1997). Contrairement aux PI3Ks de classe I, les PI3Ks de classe II sont majoritairement liées aux membranes, par des mécanismes indépendants du domaine C2 C-terminal, qui semble avoir plutôt un effet inhibiteur sur l'activité kinase, qu'un réel rôle de localisation cellulaire (Arcaro *et al.*, 1998). Les rôles précis de cette classe de PI3K ne sont pas encore très clairs, mais elle semble jouer un rôle dans le trafic vésiculaire et l'endocytose clathrine-dépendants (Gaidarov *et al.*, 2001; Gaidarov *et al.*, 2005) et la régulation du cytosquelette d'actine dans les cellules en migration (Domin *et al.*, 2005) (*Figure 9C*).

4 - Les PI3Ks de classe III

La PI3K de classe III est un hétérodimère constitué d'une sous-unité catalytique homologue de la protéine de levure Vps34p (Vacuolar-protein-sorting 34 protein) (Herman *et al.*, 1992) et d'une sous-unité régulatrice à activité Ser/Thr kinase, la p150. Les PI3Ks de classe III ont pour seul substrat spécifique, le PI (Volinia *et al.*, 1995). La région N-terminale de

Vps34p ne contient pas de RBD. La PI3K de classe III joue un rôle dans le trafic intracellulaire (Gillooly *et al.*, 2001) (Figure 9D).



C - La biologie des PI3Ks de type I_A

1 - Les mécanismes de régulation des PI3Ks I_A

a - La p110

Les nombreuses études d'inactivation ciblées de gènes menées chez la souris (Vanhaesebroeck *et al.*, 2005) ont permis de montrer que l'inactivation de *Pik3ca* (Bi *et al.*, 1999) ou *Pik3cb* (Bi *et al.*, 2002) est létale. De plus, elles ont permis de montrer que les

différentes isoformes de p110 ne semblent pas avoir de spécificité pour l'une ou l'autre des sous-unités régulatrices. Les p110 α et p110 β n'ont pas les mêmes activités catalytiques sur les lipides (Beeton *et al.*, 2000). p110 α possède une meilleure affinité pour PI(4,5)P₂ que p110 β (Beeton *et al.*, 2000). De plus, les p110 possèdent aussi une activité sérine/thréonine kinase. Les différentes isoformes de p110 ne sont pas stables dans le cytosol, ce qui explique les rôles multiples des p85 dans la stabilisation, la localisation et la régulation de l'activité de la p110.

b - Le complexe p85/p110 au repos

Les sous-unités régulatrices p85 α et p85 β étant les plus exprimées (p85 α >> p85 β), nous discuterons ici plus particulièrement des régulations qui leur sont propres.

L'interaction entre la sous-unité catalytique (p110) et la sous-unité régulatrice (p85) se fait au niveau de la région inter-SH2 (iSH2) des p85 (Fu *et al.*, 2004) et de la région N-terminale de p110 (Yu *et al.*, 1998a). En absence de stimulation, la p85 interagit avec la p110 dans le cytosol, permettant la stabilisation de celle-ci et une inhibition de son activité catalytique (Yu *et al.*, 1998b; Fruman *et al.*, 2000). Cette inhibition de l'activité catalytique nécessite la présence du domaine nSH2 (en position N-Terminale) (Yu *et al.*, 1998a). De plus, dans cette configuration, p85 empêche l'activation de la p110 par Ras via son RBD (Jimenez *et al.*, 2002).

p85 peut réguler la disponibilité de p110 (Ueki *et al.*, 2003; Ueki *et al.*, 2002). Il a été montré que p85 peut s'homodimériser via des interactions entre son domaine SH3 et son motif PR N-terminal et via des interactions BH-BH (Harpur *et al.*, 1999). Dans le contexte de la signalisation de l'insuline, les monomères de p85 peuvent entrer en compétition avec les complexes p85/p110 pour les motifs tyrosines phosphorylés de l'adaptateur, IRS (Insulin Receptor Subunit) aussi bien *in vitro* (Luo *et al.*, 2005a) qu'*in vivo* (Barbour *et al.*, 2005). Dans ce même contexte, il a été montré que l'inhibiteur de STAT, SOCS6 peut entrer en compétition avec p110 pour l'interaction avec p85 monomérique, aboutissant à une diminution de l'activité de PI3K (Li *et al.*, 2004).

c - Le complexe p85/p110 lors de l'activation de la PI3K

Après stimulation par des facteurs de croissance ou cytokines entraînant l'activation de tyrosines kinases (intrinsèques (PDGF, Insuline) ou associées aux récepteurs (IL-2, BCR)), la phosphorylation de résidus tyrosines permet le recrutement du complexe p85/p110 à la membrane sur le site d'activation grâce aux domaines SH2 de p85 (Carpenter *et al.*, 1993; Skolnik *et al.*, 1991; Kontos *et al.*, 1998; O'Brien *et al.*, 2000). Cette interaction des domaines

SH2 avec les motifs phosphorylés sur tyrosines induit des changements conformationnels qui augmentent l'activité catalytique de la p110 (Nolte *et al.*, 1996) et autorise son activation par Ras (Jimenez *et al.*, 2002; Kodaki *et al.*, 1994). De plus, p85 peut être phosphorylée sur le résidu Y⁶⁸⁸ par les kinases de la famille Src, Lck ou Abl (von Willebrand *et al.*, 1998), cette phosphorylation semble jouer un rôle dans la levée d'inhibition de la p85 sur la p110 entraînant une augmentation de l'activité de la p110 (Cuevas *et al.*, 2001; Farias *et al.*, 2005; Martinez-Lorenzo *et al.*, 2000).

Les p85 interviennent aussi lors de l'inhibition de l'activité de la p110 lors du retour à l'état basal. Les domaines SH2 de p85 peuvent interagir avec les PI(3,4,5)P₃ en induisant une diminution de l'activité (Rameh *et al.*, 1995; Chellaiah *et al.*, 2001). La phosphatase SHP1 peut, elle aussi être recrutée via les domaines SH2 de p85 et catalyser la déphosphorylation du résidu Y⁶⁸⁸, ce qui diminue l'activité de la p110 (Cuevas *et al.*, 1999). Enfin p110 α et β sont capables de phosphoryler le résidu S⁶⁰⁸ de p85 ce qui entraîne une inhibition de l'activité lipide kinase de p110 (Foukas *et al.*, 2004).

d - Autres régulations du complexe p85/p110

Les domaines SH2 de p85 ne sont pas les seuls régulateurs de son action sur la p110. Ainsi, le domaine SH3 et les motifs PR peuvent interagir avec des molécules qui inhibent l'activation ou la localisation du complexe p85/p110 comme l'adaptateur Ruk/CIN85 (Borthwick *et al.*, 2004; Gout *et al.*, 2000), mais aussi des molécules qui augmentent cette activité comme les adaptateurs Grb2 ou SOS (Ren *et al.*, 2005) ou les kinases CrkII (Gelkop *et al.*, 2001), Lyn ou Fyn dans les lymphocytes (Pleiman *et al.*, 1994).

Le domaine BH de p85 α et p85 β est la région la plus divergente entre ces 2 isoformes (Otsu *et al.*, 1991; Musacchio *et al.*, 1996). Ce domaine présente de très fortes homologies avec le domaine GAP de la protéine Bcr (Breakpoint Cluster Region). Plusieurs études ont réussi à montrer une activité GAP très faible du domaine BH pour Rac et Cdc42 (Musacchio *et al.*, 1996; Zheng *et al.*, 1994; Tolia *et al.*, 1995), et récemment une étude a montré une activité GAP du domaine BH à de fortes concentration de p85 de l'ordre de la dizaine de μ M contre nM dans les études précédentes (Chamberlain *et al.*, 2004). De plus, on sait que Rac1 et RhoG sont capables d'activer la PI3K d'une manière p85 dépendante (Murga *et al.*, 2002) et que Rac1 intervient dans la protection vis-à-vis de l'apoptose via une activation de PI3K (Fukuda *et al.*, 2005).

e - Les rôles de p85 indépendants de son association avec p110

Plusieurs études ont montré que p85 possédait des fonctions indépendantes de son rôle régulateur de l'activité de p110. p85 intervient par exemple, dans la régulation du cytosquelette d'actine en activant Cdc42 (Jimenez *et al.*, 2000) ou Rac1 (Hill *et al.*, 2001) de manière p110 indépendante. De plus, il a aussi été mis en évidence que p85, Rac1 et PAK sont impliquées dans la transcription NFAT dépendante (Kang *et al.*, 2002). Enfin, p85 est aussi capable d'induire une activité JNK dépendante de la région N-terminale de p85 (Ueki *et al.*, 2003).

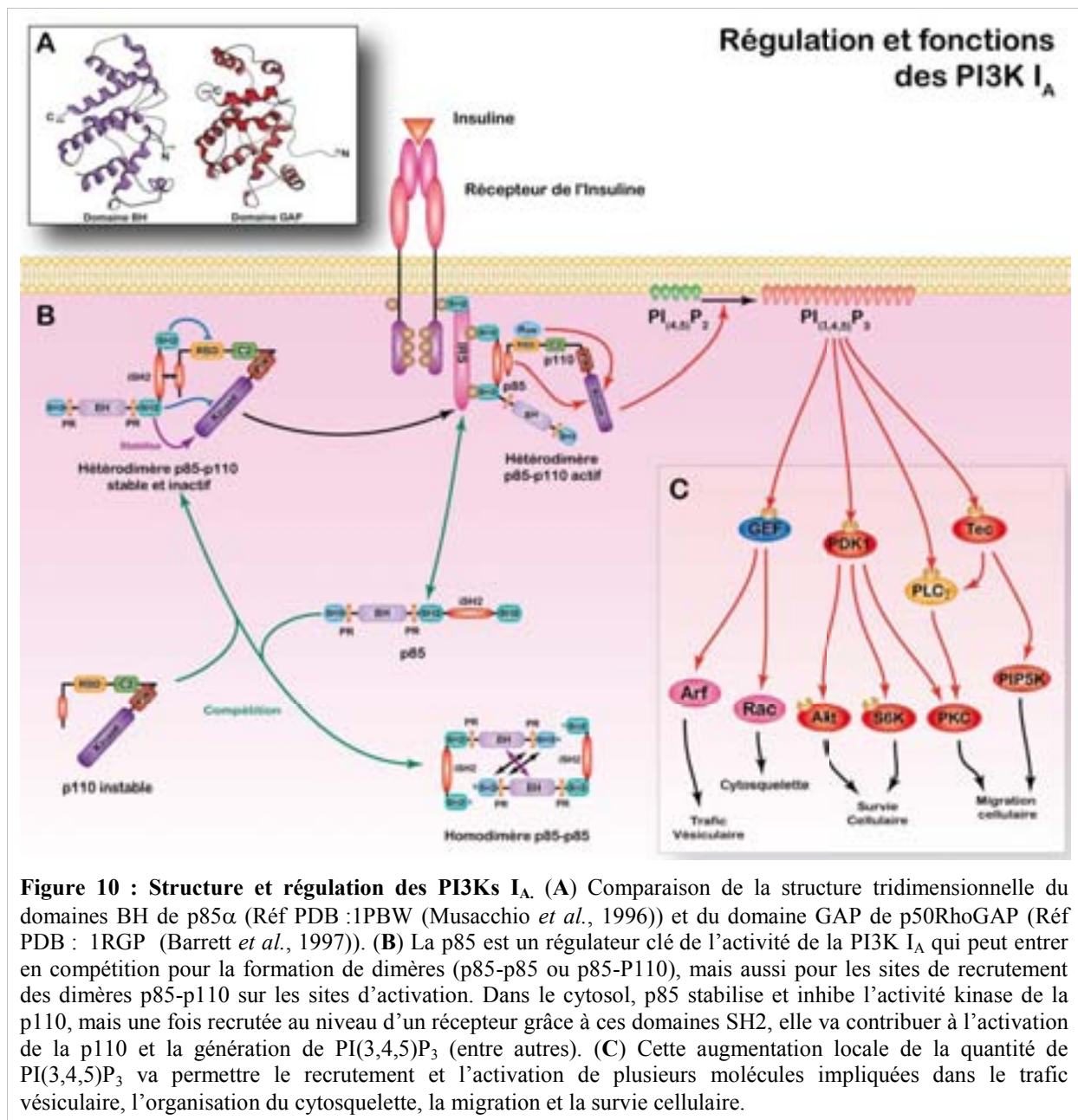
2 - Les fonctions des PI3Ks I_A

Les PI3K I_A sont impliquées dans de nombreuses fonctions cellulaires en produisant les PI(3,4,5)P₃ qui permettent le recrutement local de protéines possédant des domaines PH. Les cibles majeures des PI(3,4,5)P₃ sont les kinases Akt et PDK1, dont la biologie sera détaillée dans la *Section III* (page 46), les tyrosines kinases de la famille Tec, la PLC γ et enfin des GEFs de Rho et Arf GTPases.

Les tyrosines kinases de la famille Tec (Btk (Bruton Tyrosine Kinase) et Itk (Inductible T cell Kinase)) sont activées via le recrutement à la membrane par leur domaine PH qui est très spécifique des PI(3,4,5)P₃ (August *et al.*, 1997). Une fois localisées, elles sont activées par phosphorylation sur tyrosines par les kinases de la famille Src (Fyn) et la sérine/thréonine kinase PDK1 (Li *et al.*, 1997b). Les cibles principales de ces kinases sont la PIP5K qui intervient dans la génération de PI(4,5)P₂ (Saito *et al.*, 2003; Schwartzberg, 2003) et la PLC γ qui joue un rôle crucial dans la régulation du taux de calcium intracellulaire. Cette dernière est aussi régulée directement par les PI(3,4,5)P₃ via son domaine PH (Bae *et al.*, 1998).

Les PI3Ks I_A interviennent aussi dans la régulation du cytosquelette d'actine par les Rho GTPases. Ainsi, les PI3Ks ont été impliquées dans des réarrangements du cytosquelette en réponse au PDGF, via Rac (Hawkins *et al.*, 1995; Wennstrom *et al.*, 1994), ou Cdc42 (Jimenez *et al.*, 2000). Une des explications de ce rôle des PI3Ks sur l'activation des Rho GTPases, repose sur l'activation de GEFs. Comme nous l'avons vu précédemment (page 11), les GEFs de la famille Dbl possèdent un domaine PH qui leur confère une affinité pour les PI(3,4,5)P₃. Ainsi, l'activation de plusieurs GEFs de Rac et Cdc42 ont été mise en relation avec l'activité PI3K, que ce soit les GEFs de la famille Dbl telles que Vav1 (Prisco *et al.*, 2005), P-Rex2b (Li *et al.*, 2005b), Tiam1 (Baumeister *et al.*, 2003), ou celles de la famille DOCK180 directement via leur domaine DHR1 ou via le domaine PH de ELMO (Lu *et al.*, 2004; Lu & Ravichandran, 2006). La PI3K peut aussi participer de façon plus structurale à

l'activation, comme dans le complexe Eps8/Abi1/Sos-1 qui possède une activité Rac GEF (Innocenti *et al.*, 2003).



Les PI3Ks de classe I_A interviennent aussi dans la régulation des GTPases de la famille Arf qui jouent un rôle dans le trafic vésiculaire. Les PI(3,4,5)P₃ permettent le recrutement de GEFs de Arf telles que GRP1 (General Receptor for PI) (Klarlund *et al.*, 1998), Arno (Venkateswarlu *et al.*, 1998) ou la cytohesine 1 (Meacci *et al.*, 1997).

3 - Les inhibiteurs pharmacologiques des PI3Ks

Le rôle central joué par la PI3K dans de nombreux processus a incité à rechercher des moyens d'en abolir l'activité. Plusieurs inhibiteurs pharmacologiques plus ou moins spécifiques de la PI3K ont ainsi été décrits (Davies *et al.*, 2000). Les plus couramment utilisés sont le LY294002 (Vlahos *et al.*, 1994) et la Wortmannin (Arcaro & Wymann, 1993). Le *Tableau 9* résume les propriétés et les doses utilisés de chacun de ces inhibiteurs.

Caractéristiques	Wortmannin	LY294002
Site d'action	Site de liaison à l'ATP	Site de liaison à l'ATP
Mode d'action	Inhibition irréversible	Inhibition compétitive
IC ₅₀ pour p110α <i>in vitro</i>	2 à 5 nM	0,5 à 1,5 μM
Spectre d'action	toutes sauf PI3KC2a (IC ₅₀ ≈400 nM)	Toutes sauf PI3KC2a (IC ₅₀ ≈20 μM)
Sensibilité de l'activité protéine kinase	Idem Lipide Kinase	Idem Lipide Kinase
Stabilité en solution aqueuse	Faible	Bonne
Dose d'emploi	20 à 50 nM	5 à 20 μM

Tableau 9 : Comparaison des propriétés des inhibiteurs de la PI3K, Wortmannin et LY294002. (d'après (Stein & Waterfield, 2000)).

III - Les PI Phosphatases

A - La PI 3-Phosphatase, PTEN

1 - Généralités

La protéine PTEN (Phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10), aussi appelée MMAC1 (Mutated in Multiple Aadvanced Cancers) a tout d'abord été décrite comme un suppresseur de tumeur dans les gliomes, dont le gène est localisé sur le chromosome 10q23 (Li *et al.*, 1997a; Steck *et al.*, 1997; Myers *et al.*, 1997). PTEN est délétée ou mutée dans près de 50% des cancers (Cantley & Neel, 1999; Simpson & Parsons, 2001), mais aussi dans d'autres pathologies telles que certains types d'autismes (Butler *et al.*, 2005) ou des pathologies cardiovasculaires (Oudit *et al.*, 2004).

2 - Structure

PTEN est une protéine de 403 résidus ayant un poids moléculaire de 53 kDa. Elle est organisée en une extrémité N-terminale polybasique intervenant dans la liaison avec les PIPs, un domaine catalytique PTP (Protein Tyrosine Phosphatase) de type C_xR5 qui lui confère une activité protéine et lipide phosphatase, un domaine C2 et une extrémité C-terminale contenant un domaine de liaison au domaine PDZ (Psd95/SAP90, DLG, ZO-1) et 2 séquences PEST

impliquées dans la dégradation protéique (Leslie & Downes, 2004; Maehama *et al.*, 2001). Le domaine C2 de PTEN présente les mêmes caractéristiques que le domaine C2 C-terminal des PI3Ks de classes II (Lee *et al.*, 1999).

3 - Fonctions

PTEN possède une double activité enzymatique, protéine phosphatase et lipide phosphatase, cette dernière étant essentielle à sa fonction suppresseur de tumeur (Myers *et al.*, 1998). PTEN déphosphoryle en position 3 du cycle inositol, le PI(3)P, le PI(3,4)P₂ et le PI(3,4,5)P₃ ainsi que l'I(1,3,4,5)P₄ *in vitro*, mais son substrat préférentiel *in vivo* semble être le PI(3,4,5)P₃ (Maehama *et al.*, 2001; Vanhaesebroeck *et al.*, 2001). Cette activité lipide phosphatase fait de PTEN l'antagoniste des PI3Ks de classe I (Myers *et al.*, 1998). Dans des lignées cellulaires tumorales dépourvues de PTEN, ainsi que dans des lignées cellulaires dérivées de souris knock-out (KO) pour PTEN, les niveaux de PI(3,4,5)P₃ et de PI(3,4)P₂ sont constitutivement élevés en comparaison du phénotype sauvage (Stambolic *et al.*, 1998). L'augmentation des niveaux de PI(3,4,5)P₃ et de PI(3,4)P₂ dans ces cellules s'accompagne d'une activation d'Akt et la réintroduction de PTEN entraîne une inhibition d'Akt et d'autres cibles de la PI3K (Stambolic *et al.*, 1998; Sun *et al.*, 1999).

L'activité protéine phosphatase de PTEN intervient dans la déphosphorylation de FAK (Tamura *et al.*, 1998), du PDGFR (Mahimainathan & Choudhury, 2004) et une auto-déphosphorylation (Raftopoulou *et al.*, 2004). Ces déphosphorylations de protéines jouent un rôle dans l'adhérence et la migration cellulaire (Mahimainathan & Choudhury, 2004; Tamura *et al.*, 1998).

4 - Localisation et régulation de PTEN

Malgré ces sites d'interaction avec les lipides (N-terminal et C2) et des protéines (liaison au PDZ), PTEN est une protéine majoritairement cytosolique et nucléaire (Lachyankar *et al.*, 2000). Les gradients de répartition subcellulaire de PTEN jouent un rôle important dans l'établissement de gradient de PI(3,4,5)P₃ impliqués dans la migration (Cf. page 24) (Li *et al.*, 2005a; Li *et al.*, 2003) et la cytokinèse (Janetopoulos *et al.*, 2005), mais les mécanismes entrant dans la formation de ces gradients ne sont pas encore connus.

La régulation de l'activité de PTEN n'est pas entièrement caractérisée. Des sites de phosphorylation sur sérine/thréonine ont été mis en évidence, principalement la S³⁷⁰ et la S³⁸⁵. Ces phosphorylations semblent avoir un rôle inhibiteur sur PTEN en l'empêchant d'adopter la conformation la plus adaptée à son activité et de lier les protéines à domaine PDZ (Vazquez *et al.*, 2001). Actuellement plusieurs kinases ont été identifiées comme pouvant phosphoryler

PTEN, CK2 (Casein Kinase 2) (Torres & Pulido, 2001), LKB1 (Mehenni *et al.*, 2005), MAST205 (Microtubule-Associated Serine/Threonine kinases) (Valiente *et al.*, 2005), GSK3 β (Glycogen Synthase Kinase 3 β) (Al-Khoury *et al.*, 2005) et ROCK (Li *et al.*, 2005a). Ce dernier cas, met en relation la localisation et l'activité de PTEN lors de la migration, avec celles des Rho GTPases (Li *et al.*, 2005a). Un autre mode de régulation de l'activité de PTEN est l'oxydation réversible d'un résidu cystéine dans le domaine catalytique (Lee *et al.*, 2002; Leslie *et al.*, 2003).

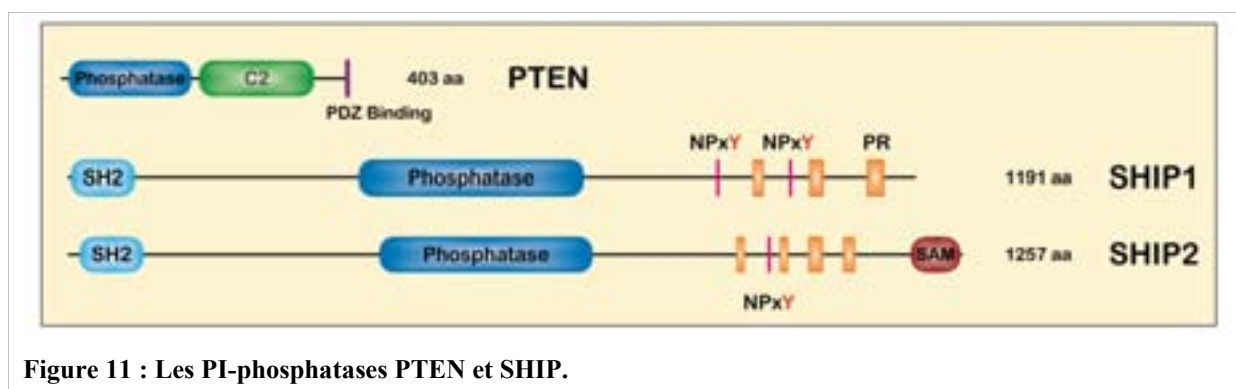


Figure 11 : Les PI-phosphatases PTEN et SHIP.

B - La PI 5-Phosphatase, SHIP

1 - Généralités

La protéine SHIP (SH2 containing Inositide 5 Phosphatase) a été initialement décrite comme une protéine de 145 kDa dont la phosphorylation sur tyrosine est induite par de nombreux facteurs de croissances et cytokines dans les cellules hématopoïétiques (Damen *et al.*, 1993; Kavanaugh & Williams, 1994). Ce n'est qu'en 1996 que son activité PI 5-phosphatase a été mise en évidence (Damen *et al.*, 1996).

2 - Les différentes isoformes de SHIP

La famille des Phosphatases SHIP contient 2 membres, SHIP1 (hématopoïétique) et SHIP2 (ubiquitaire). Plusieurs isoformes de SHIP1 ont été décrites avec différents poids moléculaires 145 kDa, 135 kDa, 125 kDa et 110 kDa. Ces différentes isoformes sont toutes codées par le même gène et issues soit d'un épissage alternatif interne (SHIP1 α (145 kDa), SHIP1 β (135 kDa) et SHIP1 δ (110 kDa)) (Wolf *et al.*, 2000; Lucas & Rohrschneider, 1999), soit d'une initiation de la traduction décalée qui ampute la protéine de ses 214 premiers résidus (SHIP110 ou SHIP1 γ (110 kDa)) (Kavanaugh *et al.*, 1996; Tu *et al.*, 2001), soit enfin, de dégradation post-traductionnelles de l'extrémité C-terminale par les calpaïnes (Damen *et al.*, 1998). Mais la pertinence *in vivo* de ce dernier point reste toujours sujet à controverse

(Horn *et al.*, 2001). La protéine SHIP2 est une protéine de 155 kDa codée par un gène différent de SHIP1.

3 - Structure

La séquence codante de SHIP1 α a été clonée en 1996 par 3 équipes indépendantes en 1996 (Damen *et al.*, 1996; Lioubin *et al.*, 1996; Kavanaugh *et al.*, 1996). Cette séquence de 1190 résidus code pour une protéine d'un poids moléculaire théorique de 145 kDa. La protéine SHIP est constituée d'une région N-terminale contenant un motif SH2, d'un domaine catalytique central à activité PI 5-phosphatase (400-500 résidus) et d'une région C-terminale contenant plusieurs motifs d'interaction protéine-protéine. Cette région C-terminale contient 2 motifs de phosphorylation sur tyrosine (NPxY) permettant la liaison de protéines à domaines PTB (PhosphoTyrosine Binding) ou SH2, ainsi que plusieurs PR permettant la liaison de protéines à domaines SH3.

SHIP2 est une protéine de 1258 résidus pour un poids moléculaire de 155 kDa. Elle présente 42.7 % d'identité avec SHIP1 α (Pesesse *et al.*, 1997). SHIP2 est composée d'un domaine SH2 (54% d'identité avec SH2 de SHIP1 α (Krystal *et al.*, 1999)), suivi d'un domaine catalytique (64 % d'identité avec SHIP1 α) et une région C-terminale contenant un seul motif NPxY, plusieurs motifs PR et un domaine SAM (Sterile Alpha Motif) qui permet des interactions homophiliques et hétérophiliques (avec les domaines SH2) (Schultz *et al.*, 1997; Peterson *et al.*, 1997).

4 - Fonctions

a - Les fonctions liées à l'activité phosphatase

Les protéines SHIP sont des PI 5-phosphatases qui hydrolysent le PI(3,4,5)P₃ en PI(3,4)P₂ et l'I(1,3,4,5)P₄ en I(1,3,4)P₃ *in vitro* (Damen *et al.*, 1996; Lioubin *et al.*, 1996; Pesesse *et al.*, 1997). *In vivo*, leur substrat préférentiel est le PI(3,4,5)P₃ (Brauweiler *et al.*, 2000; Scheid *et al.*, 2002b; Wada *et al.*, 2001). Ce sont donc des régulateurs négatifs de la quantité de PI(3,4,5)P₃ dans la membrane.

Les fonctions de SHIP1 sont restreintes à son expression, c'est-à-dire les cellules hématopoïétiques. Dans les lymphocytes B, SHIP1 est associée à la régulation négative du co-engagement du BCR (B-Cell Receptor) et du récepteur du fragment Fc des IgG, le Fc γ RIIB (Fc γ fragment Receptor IIB) par l'antigène et les IgG sécrétées (Ganesan *et al.*, 2006; Isnardi *et al.*, 2006; Lioubin *et al.*, 1996). Dans ce contexte SHIP est recruté au niveau de motifs tyrosines phosphorylés, les ITIMs (Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibition Motif) situés dans le domaine cytoplasmique du Fc γ RIIB. Ce recrutement à la membrane induit une diminution de la

quantité de PI(3,4,5)P₃, ce qui entraîne une diminution de l'activation de Btk, de PLC γ (Lioubin *et al.*, 1996), mais aussi d'Akt (Carver *et al.*, 2000). SHIP2 est capable de remplir les mêmes fonctions que SHIP1 dans les lymphocytes B (Muraille *et al.*, 2000; Bruhns *et al.*, 2000) et ce, même en absence de SHIP1 (Brauweiler *et al.*, 2000).

b - Les fonctions indépendantes de l'activité phosphatase

Les SHIPs possèdent plusieurs résidus tyrosines phosphorylables dans leur région C-terminale. La phosphorylation de ces résidus ne semble pas jouer de rôle dans l'activité catalytique (Taylor *et al.*, 2000). L'activité des SHIP semble être régulée par la localisation de celles-ci à la membrane, aux sites de production des PI(3,4,5)P₃, par de nombreux adaptateurs tels que Shc (Habib *et al.*, 1998a; Habib *et al.*, 1998b; Ishihara *et al.*, 1999; Pesesse *et al.*, 2001), Dok (Ganesan *et al.*, 2006; Tamir *et al.*, 2000) ou p130^{CAS} (Prasad *et al.*, 2001; Prasad & Decker, 2005). Cette dépendance de la localisation a été montrée dans de nombreuses stimulations par des facteurs de croissance (Phee *et al.*, 2000).

SHIP intervient aussi en tant que régulateur négatif de la voie d'activation des MAPKs par Ras en stimulant l'activité GAP de RasGAP via l'adaptateur Dok (Tamir *et al.*, 2000; Ganesan *et al.*, 2006) ou en entrant en compétition avec le complexe Grb2/Sos pour l'adaptateur Shc, cela a été décrit en réponse à l'insuline (Ishihara *et al.*, 1999), l'EGF (Pesesse *et al.*, 2001), et plusieurs autres facteurs de croissance (Habib *et al.*, 1998b; Habib *et al.*, 1998a), ce qui fait de ce mécanisme un mode d'inhibition de la voie des MAPKs par SHIP indépendant de son activité phosphatase.

c - SHIP et le cytosquelette

SHIP2 interagit avec p130^{CAS}, un adaptateur important dans l'organisation du cytosquelette d'actine (Prasad *et al.*, 2001), ainsi qu'avec la vinexine (Paternotte *et al.*, 2005). L'adhérence des cellules au Collagène I induit la phosphorylation de SHIP2 (Prasad *et al.*, 2001; Paternotte *et al.*, 2005). SHIP2 est localisée aux adhésions focales ainsi qu'aux lamellipodes (Prasad *et al.*, 2001). De plus, la surexpression de SHIP2 augmente l'adhérence cellulaire (Prasad *et al.*, 2001; Paternotte *et al.*, 2005). SHIP2 pourrait donc jouer un rôle dans l'adhérence cellulaire.

Section III : La Kinase Akt

I - Généralités

A - Généralités

La découverte d'Akt débute en 1977 par l'isolation du rétrovirus murin AKT8 à partir d'une lignée de thymome issue d'une souris AKR (Staal *et al.*, 1977). Ce virus induit la transformation de la lignée épithéliale pulmonaire de vison CCL-64. Le produit de ce virus est un oncogène, v-Akt dont on a identifié 2 homologues Akt1 et Akt2 chez la souris (Staal, 1987; Staal *et al.*, 1988). C'est 14 ans plus tard qu'un homologue de cet oncogène a été identifié chez l'homme par 3 groupes indépendants comme étant une kinase de la famille AGC (cAMP, cGMP, Ca²⁺ induced Kinases). Le groupe de Jones a identifié une kinase capable de phosphoryler l'histone H1 *in vitro* (Jones *et al.*, 1991b). Ils ont appelé cette kinase RAC Protein Kinase (Related with Protein Kinase A and C Protein Kinase), mais cette dénomination n'est plus utilisée. Le groupe de Bellacosa a cloné un homologue cellulaire de v-Akt, c-Akt, et montré que v-Akt est une protéine issue de la recombinaison entre le gène viral GAG et le gène c-Akt. De plus, ils ont aussi montré qu'Akt possédait des similitudes avec les kinases PKC et PKA (Bellacosa *et al.*, 1991). Enfin, le troisième groupe a identifié par PCR une kinase qu'il appela PKB (Protein Kinase B) qui présentait des homologies avec PKA et PKC (Coffer & Woodgett, 1991).

Au final il s'avère que ces trois protéines étaient en fait identiques. Akt/PKB est donc une sérine/thréonine kinase de 57 kDa de la famille des kinases AGC. Cette famille regroupe un ensemble de kinases, partageant structure et mode d'activation. Parmi les autres membres de la famille on trouve SGK (Serum and Glucocorticoid induced Protein Kinase), p70^{S6K} (p70 S6 Kinase), PKC α , p90^{RSK} (p90 Ribosomal S6 Kinase). Par souci de simplification Akt/PKB sera toujours nommée Akt, dans la suite du manuscrit.

B - Isoformes d'Akt et données des souris KO

Chez l'homme on a identifié 3 gènes codant pour 3 protéines Akt : Akt1/PKB α , Akt2/PKB β , Akt3/PKB γ (Tableau 10). Ces 3 gènes donnent naissance à 5 protéines différentes dont 2 variants d'épissage, Akt2/PKB β 1 (Jones *et al.*, 1991a) et Akt3/PKB γ 1 (Brodbeck *et al.*, 2001; Wennerberg *et al.*, 2002) (Figure 12A).

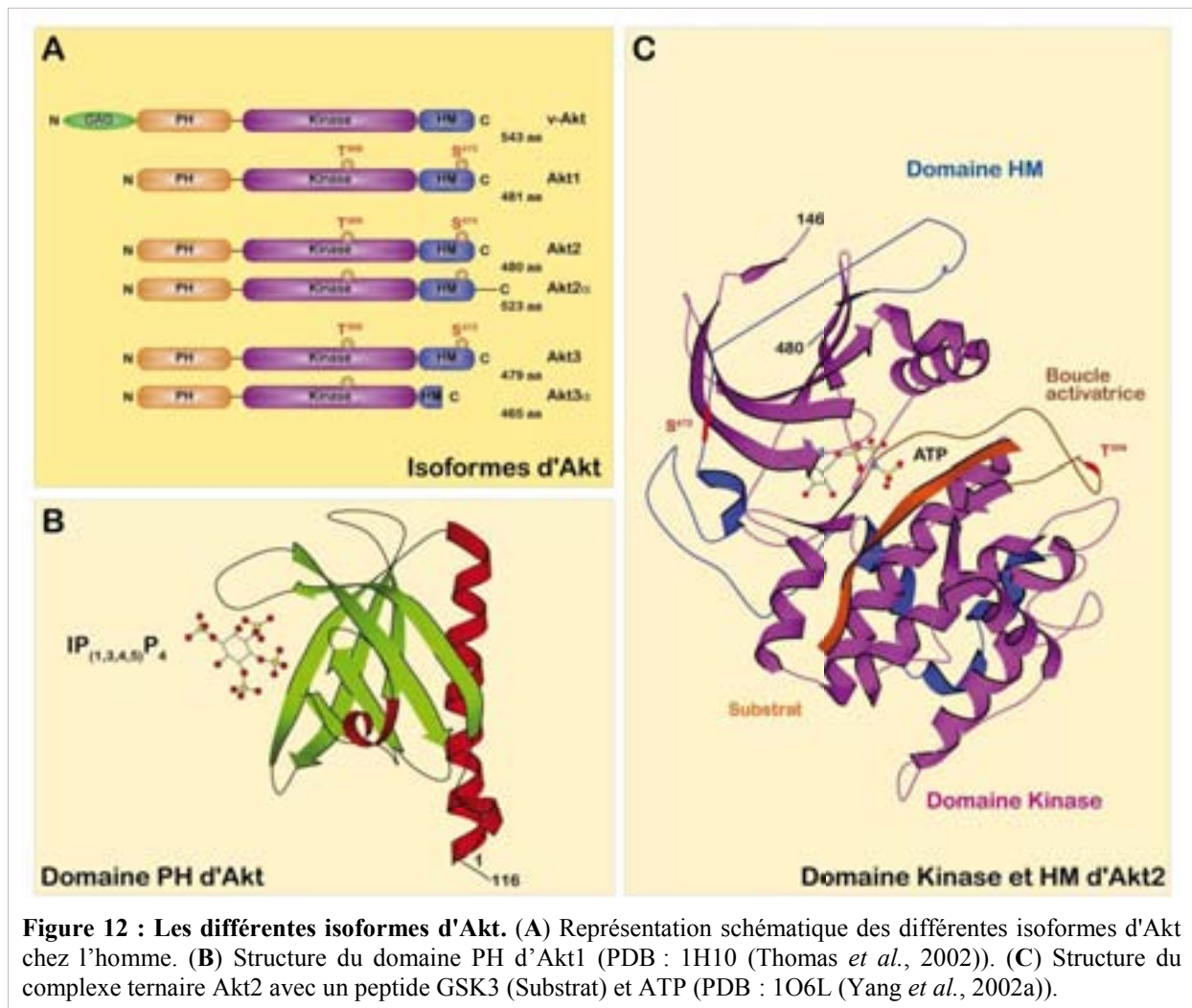
La famille des kinases Akt est très conservée dans l'évolution. Elle présente près de 95% d'identité en acides aminés entre le rat, la souris et l'homme et 60% entre l'homme et *C. elegans* (Franke *et al.*, 1994). Les 3 isoformes d'Akt sont exprimées différemment en fonction des tissus et cela aussi bien au niveau protéique que mRNA (Tableau 10).

	Gène	Protéine (résidus)	Expression		Homologie avec Akt1		Références
			Forte	Faible			
Akt1/PKBα	14q32	480	Cerveau Cœur Thymus Testicule	Foie Rein Rate	PH Kinase HM	100 % 100 % 100 %	(Staal <i>et al.</i> , 1988)(Bellacosa <i>et al.</i> , 1993; Kontos <i>et al.</i> , 1998)
Akt2/PKBβ	19q13	481	Tissu adipeux brun Cervelet Cœur Muscle Sq.	Cerveau Rein Poumon Rate Testicule	PH Kinase HM	80 % 90 % 66	(Chen <i>et al.</i> , 2001a; Chen <i>et al.</i> , 2001b; Altomare <i>et al.</i> , 1998; Bellacosa <i>et al.</i> , 1995)
Akt3/PKBγ	1q43	479	Cerveau Testicule	Cœur Rein Foie	PH Kinase HM	84 % 88 % 76	(Murthy <i>et al.</i> , 2000; Nakatani <i>et al.</i> , 1999)
						100 % 81 % 81 %	

Tableau 10 : Comparaison des 3 Isoformes d'Akt

Les phénotypes des souris KO permettent d'envisager certains rôles d'Akt. Les souris Akt1^{-/-} présentent des problèmes de croissance et de régulation de l'apoptose, mais répondent normalement à l'insuline (Cho *et al.*, 2001b; Chen *et al.*, 2001b). Les souris Akt2^{-/-} ont une taille normale, mais présentent une résistance à l'insuline et un phénotype diabétique (Cho *et al.*, 2001a). Les souris Akt1-2 double KO meurent peu après la naissance. Elles présentent un nanisme et une masse diminuée de 50%. Elles ont une peau translucide (défaut de prolifération des kératinocytes, mais pas de problème de différenciation), présentent une atrophie sévère des muscles squelettiques, et un défaut de l'adipogenèse (tissu brun) (Peng *et al.*, 2003).

D'autres études d'expression de mutants dominants actifs ciblés dans certains tissus ont permis de mettre en évidence d'autres rôles d'Akt. L'expression de GAG-Akt1 (Dominant Actif) dans des lymphocytes T a mis en évidence une résistance accrue à l'apoptose, la formation de tumeur et une augmentation de l'auto-immunité avec l'âge (Jones *et al.*, 2000; Malstrom *et al.*, 2001). La surexpression d'une forme activée d'Akt1 (Akt-308D473D) dans des progéniteurs neuronaux (Holland *et al.*, 2000) ou dans des glandes mammaires de souris (Hutchinson *et al.*, 2001) a permis de mettre en évidence une augmentation de la formation de tumeur, mais seulement en présence d'un mutant actif de K-Ras ou de l'oncogène T muté (augmentation de l'activité de Ras).



C - Quelques données structurales

Toutes les isoformes d'Akt sont construites sur un modèle unique comprenant un domaine PH N-terminal (Franke *et al.*, 1994a), un domaine central sérine/thréonine kinase (Ahmed *et al.*, 1993) et un domaine HM (Hydrophobic Motif) C-terminal important dans la régulation de l'activité kinase (Chan *et al.*, 1999).

1 - Le domaine PH

Le domaine PH d'Akt s'étend entre les résidus 1 et 107 (Akt1) (Figure 12B). Nous avons déjà vu la structure et la fonction des domaines PH dans un paragraphe précédent ((page 33) ; Figure 4B). Les domaines PH des différentes isoformes d'Akt présentent plus de 80 % d'identité entre eux et environ 30 % avec les autres domaines PH (Tableau 10 (page 48)). Le domaine PH d'Akt lui confère une affinité pour les $PI(3,4)P_2$ et $PI(3,4,5)P_3$ *in vitro* (Alessi *et al.*, 1997b; James *et al.*, 1996; Stokoe *et al.*, 1997) et *in vivo* (Banfic *et al.*, 1998). Plusieurs protéines ont montré une capacité de liaison pour le domaine PH d'Akt, nous les

détaillerons dans un paragraphe ultérieur (page 56). De plus le domaine PH d'Akt joue aussi un rôle inhibiteur de l'activité kinase lorsqu'il n'est pas lié aux PIPs (Milburn *et al.*, 2003).

2 - Le domaine catalytique

Le domaine catalytique d'Akt s'étend sur 260 résidus (146-408) et possède une activité sérine/thréonine kinase. Il est conservé à plus de 90 % entre les différentes isoformes d'Akt (*Tableau 10* (page 48)) et est très voisin de celui de PKA, p70^{S6K}, SGK et PKC. Comme toutes les kinases de la famille AGC, le domaine catalytique d'Akt possède une boucle d'activation contenant un résidu primordial pour son activité, la T³⁰⁸ (Akt1) (*Figure 12B*). L'activation d'Akt nécessite la phosphorylation de ce résidu, ainsi que celle de la S⁴⁷³ (Akt1) dans le domaine HM (Alessi *et al.*, 1996a). Le domaine kinase d'Akt est formé de 2 lobes séparé par une boucle activatrice (Huang *et al.*, 2003b; Yang *et al.*, 2002a). L'étude cristallographique de la structure d'Akt2 sous forme active (Yang *et al.*, 2002a) et inactive (Huang *et al.*, 2003b) a montré qu'en absence de phosphorylations (T³⁰⁸ et S⁴⁷³), le lobe N-terminal et la boucle activatrice d'Akt se trouvent dans une conformation désordonnée qui ne permet pas d'interagir avec l'ATP et/ou son substrat. La phosphorylation du résidu T³⁰⁸, stabilise la boucle activatrice et celle du résidu S⁴⁷³ induit un changement conformationnel dans lequel le domaine HM vient stabiliser le lobe N-terminal du domaine catalytique (Yang *et al.*, 2002b; Yang *et al.*, 2002a). Dans sa configuration active la structure du domaine kinase d'Akt est très proche de celle de PKA (Brazil & Hemmings, 2001; Knighton *et al.*, 1991).

Le domaine catalytique d'Akt reconnaît et phosphoryle spécifiquement des protéines contenant une séquence consensus de type **RxRxxS/T-Hyd** (x : résidu indifférent, Hyd : résidu hydrophobe (F ou L)) (Alessi *et al.*, 1996b).

3 - Le domaine HM

Le domaine HM est une séquence hydrophobe qui s'étend sur une soixantaine de résidus à l'extrémité C-terminale d'Akt. Les domaines HM sont conservés à près de 70 % entre les différentes isoformes d'Akt (*Tableau 10* (page 48)). Ce domaine contient 2 motifs PR (**PxxP**) reconnus par les domaines SH3 de plusieurs molécules, telles que POSH (Plenty Of SH3). Cette région d'Akt contient aussi le second résidu dont la phosphorylation est nécessaire à l'activation d'Akt, la S⁴⁷³ (Akt1). La phosphorylation de ce résidu induit des changements conformationnels permettant au domaine HM de stabiliser le domaine catalytique. Un autre résidu intéressant a été localisé dans cette région, le résidu D⁴⁶², à l'extrémité N-terminale. Ce résidu représente un site de clivage potentiel d'Akt par les caspases. Cette dégradation a été observée en cas de déprivation en sérum (Xu *et al.*, 2002b).

II - Mécanismes de l'activation et de régulation d'Akt

A - Les signaux qui activent Akt

Akt peut être activée en réponse à la stimulation de récepteurs à activité tyrosine kinase ou à tyrosine kinase associée, des récepteurs couplés aux protéines G, ainsi qu'en réponse à de nombreux stress (*Tableau 11*).

Tyrosines Kinases	Récepteurs couplés aux Protéines G	Autres
Angiopoïétine	Bradykinine	Vanadate
EGF; bFGF	C5a	Acide Okadaïque
Insuline; IGF1 et 2	Carbachol	Toxine Coquelucheuse (<i>B. pertussis</i>)
Fibronectine	Endotheline	Cadmium; Zinc
Interleukines 2, 4 et 15	GRO α	S1P
Interleukines 3 et 5	fMet-Leu-Phe	Nitroresside de Na
PDGF; VEGF; NGF	μ Opioids	H ₂ O ₂
NMDA	PAF	Choc thermique
SCF	RANTES	Stress mécanique
	Interleukine 8	Hypoxie

Tableau 11 : Les activateurs d'Akt (d'après (Datta *et al.*, 1999) et (Brazil & Hemmings, 2001))

B - Le mode d'activation d'Akt

Comme nous l'avons déjà vu l'activation d'Akt nécessite la phosphorylation de 2 résidus, un dans le domaine catalytique, la T³⁰⁸ et un dans le domaine HM, la S⁴⁷³. La phosphorylation d'Akt en T³⁰⁸ stimule l'activité enzymatique d'un facteur 100, et celle de S⁴⁷³ ajoute un facteur 10, ce qui représente un facteur d'activation x1000 pour Akt phosphorylée sur les 2 sites (Alessi *et al.*, 1996b). Nous nous intéresserons tout d'abord aux kinases responsables de ces phosphorylations, avant de décrire le modèle d'activation actuel d'Akt.

1 - PDK1 : la kinase du résidu T³⁰⁸

PDK1 a été identifié à l'origine comme étant la kinase responsable de la phosphorylation du résidu T³⁰⁸ d'Akt1 (Alessi *et al.*, 1997a; Alessi *et al.*, 1997b; Stephens *et al.*, 1998). C'est une protéine de 556 résidus exprimée de manière ubiquitaire. Elle possède un domaine sérine/thréonine kinase N-terminal et un domaine PH C-terminal (Alessi *et al.*, 1997b). Ses substrats les plus connus sont PKA (Cheng *et al.*, 1998), p70^{S6K} (Pullen *et al.*, 1998), p90^{RSK} (Jensen *et al.*, 1999; Richards *et al.*, 1999), SGK (Kobayashi & Cohen, 1999; Kobayashi *et al.*, 1999), PKC (Balendran *et al.*, 2000; Le Good *et al.*, 1998; Dong *et al.*, 1999), PKN (Dong *et al.*, 2000), PAK (King *et al.*, 2000).

Pendant longtemps PDK1 a été considérée comme constitutivement active, la régulation de son activité s'effectuant par translocation à la membrane (Casamayor *et al.*, 1999).

Cependant, plusieurs études récentes ont montré qu'en plus des mécanismes de translocation vers la membrane, des phosphorylations et des changements conformationnels intervenaient dans cette régulation (Mora *et al.*, 2004; Biondi, 2004; Wick & Liu, 2001). Le domaine PH de PDK1 reconnaît préférentiellement le PI(3,4,5)P₃ et participe à la localisation membranaire de la protéine (Currie *et al.*, 1999). Mais son rôle ne s'arrête pas là, car le domaine PH de PDK1 intervient aussi comme un inhibiteur de l'activité kinase de PDK1 quand il n'est pas lié aux PIPs (Filippa *et al.*, 2000; Wick *et al.*, 2000). PDK1 contient plusieurs sites d'autophosphorylation (Casamayor *et al.*, 1999; Wick *et al.*, 2002), ainsi qu'une sérine de la boucle d'activation (S²⁴¹) (Wick *et al.*, 2003) dont la phosphorylation est augmentée en réponse à l'insuline (Kondo & Kahn, 2004).

2 - PDK2 : le mystère de la kinase du résidu S⁴⁷³

La phosphorylation du résidu S⁴⁷³ d'Akt induit un changement conformationnel qui stabilise le domaine kinase. La kinase responsable de cette phosphorylation est toujours inconnue à ce jour et est nommée PDK2 par homologie avec PDK1. Au fil des années plusieurs candidats ont été proposés, mais aucun consensus ne ressort de ces études.

Une des premières hypothèses fut que l'activité PDK2 (S⁴⁷³ Kinase) soit attribuable à PDK1. Ceci via un petit fragment C-Terminal de PRK2 (Protein Kinase C-Related Kinase-2) qui convertirait PDK1 en PDK2 (Balendran *et al.*, 2000), mais le fait qu'Akt puisse être phosphorylée en position S⁴⁷³ dans des cellules embryonnaire PDK1^{-/-} en réponse à l'IGF I relativise ces résultats (Williams *et al.*, 2000).

Une seconde hypothèse fut que PDK2 n'existe pas mais que la phosphorylation de S⁴⁷³ se produit par l'autophosphorylation d'Akt (Toker & Newton, 2000). Cette hypothèse est contre balancée par plusieurs observations. Tout d'abord, il n'est pas évident que la phosphorylation d'Akt sur le résidu T³⁰⁸ soit suffisante pour induire une autophosphorylation du site S⁴⁷³ *in vivo*. De plus, une stimulation de la phosphorylation du résidu T³⁰⁸ par l'expression d'une forme constitutivement active de PDK1 stimule très peu la phosphorylation du résidu S⁴⁷³ (Wick *et al.*, 2000). Enfin, dans plusieurs cas les phosphorylations des 2 sites sont indépendantes l'une de l'autre (Alessi *et al.*, 1996a). Il semble donc que l'hypothèse de l'autophosphorylation du résidu S⁴⁷³ ne soit pas un mécanisme déterminant dans l'activation d'Akt en réponse à de facteurs de croissance.

La troisième hypothèse, c'est-à-dire l'existence d'une kinase distincte de PDK1 pour la phosphorylation d'Akt, reste donc l'hypothèse la plus probable, et le nombre des candidats pour cette fonction augmente chaque année (ou presque). Les candidats pour le rôle de PDK2

sont résumés dans le *Tableau 12*. Ces derniers mois de nombreuses publications ont permis de mettre en avant un de ces candidats, Rictor (Rapamycin insensitive companion of mTOR).

PDK2 Potentielle	Arguments	Références
MAPKAP-K2	Arguments pour MAPKAP-K2 phosphoryle le résidu S ⁴⁷³ <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i> dans les neutrophiles	(Alessi <i>et al.</i> , 1996b; Rane <i>et al.</i> , 2001)
	Arguments contre La suppression de l'activité de MAPKAP-K2 ne modifie pas la phosphorylation de S ⁴⁷³ induite par différents facteurs de croissance et stress	(Shaw <i>et al.</i> , 1998)
ILK	Arguments pour ILK phosphoryle GST-Akt sur le résidu S ⁴⁷³ <i>in vitro</i> .	(Delcommenne <i>et al.</i> , 1998)
	La suppression d'ILK aboutit à une inhibition de la phosphorylation du résidu S ⁴⁷³ d'Akt plus ou moins complète	(Nho <i>et al.</i> , 2005; Edwards <i>et al.</i> , 2005; Troussard <i>et al.</i> , 2006)
	Arguments contre La phosphorylation d'Akt sur le résidu S ⁴⁷³ dans des cellules déficientes pour ILK n'est pas toujours modifiée.	(Sakai <i>et al.</i> , 2003; Grashoff <i>et al.</i> , 2003)
	La surexpression d'une forme d'ILK kinase-déficiente n'inhibe pas la phosphorylation du résidu S ⁴⁷³ en réponse à l'Insuline ILK n'est pas capable de phosphoryler Akt en S ⁴⁷³ <i>in vitro</i>	(Lynch <i>et al.</i> , 1999) (Balendran <i>et al.</i> , 1999; Hill <i>et al.</i> , 2002; Lynch <i>et al.</i> , 1999)
Ces dernières observations soulèvent le doute sur le rôle de l'activité kinase d'ILK dans la phosphorylation d'Akt en S ⁴⁷³ , et place ILK dans un rôle d'adaptateur jouant un rôle indirect dans cette phosphorylation.		
p38	L'inhibition de l'activité de p38 entraîne une inhibition de la phosphorylation d'Akt en S ⁴⁷³ induite par divers stimuli dans les neutrophiles	(Rane <i>et al.</i> , 2001)
	L'activation de p38, dans les cellules HEK-293 induit l'activation d'Akt	(Rane <i>et al.</i> , 2001)
	L'inhibition de p38 inhibe la phosphorylation d'Akt en S ⁴⁷³ induite par le LPA, la S1P, le PDGF, l'EGF, la Thrombine et l'Endothéline 1 La phosphorylation et l'activation d'Akt durant la différenciation des myoblastes est dépendante de p38	(Baudhuin <i>et al.</i> , 2002) (Gonzalez <i>et al.</i> , 2004)
Il semblerait que le rôle de p38 dans la phosphorylation du résidu S ⁴⁷³ d'Akt dépende de la voie d'activation d'Akt. Cela dit, il doit encore être établi si p38 agit directement ou non sur la phosphorylation d'Akt.		
PKC	PKC α et PKC β II phosphoryle la S ⁴⁷³ , <i>in vitro</i> et en réponse à l'IGF1 ou aux IgE.	(Partovian & Simons, 2004; Kawakami <i>et al.</i> , 2004)
	PKC ζ , semble intervenir dans la phosphorylation du résidu S ⁴⁷² d'Akt3.	(Hodgkinson <i>et al.</i> , 2002).
DNA-PKcs	Arguments pour DNA-PKcs est capable de phosphoryler le résidu S ⁴⁷³ d'Akt <i>in vitro</i> et son activité est inhibée par les inhibiteurs de PI3K.	(Feng <i>et al.</i> , 2004; Lu <i>et al.</i> , 2006)
	Arguments contre L'inhibition de l'expression de DNA-PKcs par RNAi n'abolit pas totalement la phosphorylation du résidu S ⁴⁷³ , suggérant une fois de plus que DNA-PKcs n'est pas l'unique PDK2.	(Feng <i>et al.</i> , 2004; Lu <i>et al.</i> , 2006)
mTOR	mTOR complexé avec Rictor (TORC2) est capable de phosphoryler le résidu S ⁴⁷³ d'Akt <i>in vitro</i> et dans les cellules.	(Sarbasov <i>et al.</i> , 2004; Sarbasov <i>et al.</i> , 2005)

Tableau 12 : Les PDK2 potentielles. Abréviations : DNA-PKcs (DNA-dependent Protein Kinase catalytic subunit); ILK (Integrin-Linked Kinase); MAPKAP-K2 (MAPK Activated Protein Kinase 2); mTOR (mammalian Target Of Rapamycin); Rictor (Rapamycin insensitive companion of mTOR).

3 - Le(s) modèle(s) d'activation d'Akt

Le modèle classique d'activation d'Akt fait intervenir la production de PI(3,4,5)P₃ par les PI3Ks de type I en réponse à une stimulation (*Tableau 11*). Cette production locale permet le recrutement d'Akt et de PDK1 à la membrane via leur domaine PH. Il a été montré que le

domaine PH est nécessaire à la phosphorylation d'Akt par PDK1 *in vitro*, en présence de $PI(3,4,5)P_3$ et $PI(3,4)P_2$ (Alessi *et al.*, 1997a; Bellacosa *et al.*, 1998; Stokoe *et al.*, 1997). Comme pour PDK1, le domaine PH d'Akt ne joue pas simplement un rôle de recrutement au niveau des PIPs, il joue aussi un rôle inhibiteur de l'activité d'Akt au repos et sa liaison aux PIPs lève cette inhibition (Milburn *et al.*, 2003). Une fois recrutée à la membrane Akt va être phosphorylée en T³⁰⁸ par PDK1 et en S⁴⁷³ par PDK2. L'ordre dans lequel se font ces phosphorylation n'est pas clairement établi et certains montrent que la phosphorylation du résidu T³⁰⁸ précède celle du résidu S⁴⁷³, alors que d'autres postulent l'inverse. Cette question ne pourra être résolue qu'une fois que l'identité de(s) PDK2 sera bien définie.

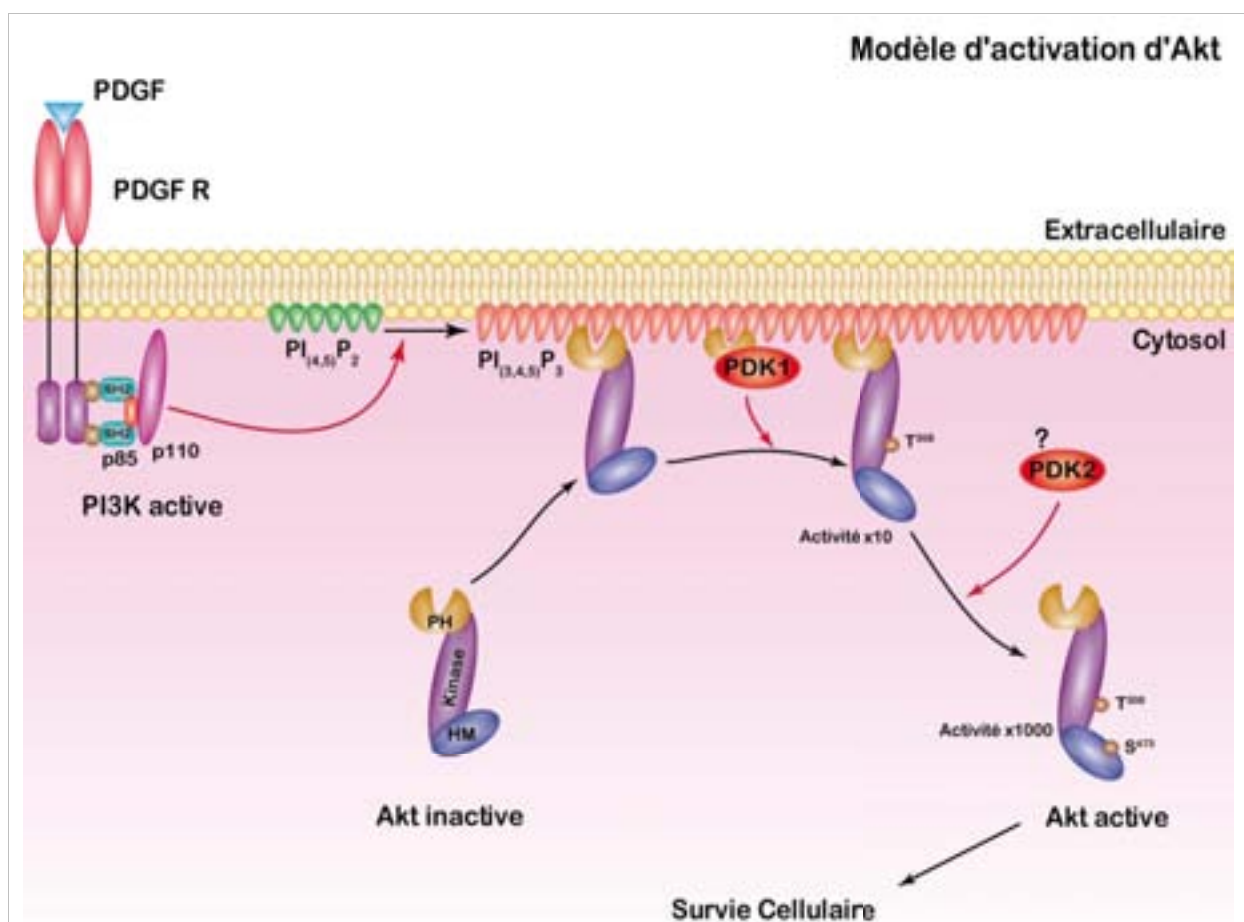


Figure 13 : Modèle d'activation d'Akt. La fixation du PGDF sur son récepteur entraîne l'activation de son activité tyrosine kinase. La phosphorylation de certains résidus tyrosines crée des sites de recrutement pour le complexe PI3K (p85/p110). Une fois, recruté ce complexe catalyse la phosphorylation des PIPs en position 3, générant entre autres des $PI(3,4,5)P_3$ qui vont permettre le recrutement d'Akt inactif du cytoplasme vers la membrane ainsi que celui de PDK1 via leur domaine PH. PDK1 va ensuite phosphoryler Akt en position T³⁰⁸, puis une seconde kinase, dont la nature n'est pas connue (PDK2) phosphoryle le résidu S⁴⁷³. L'activité d'Akt est multipliée par 1000 quand les 2 sites sont phosphorylés. Une fois activée, Akt va phosphoryler ses substrats et jouer son rôle dans la survie cellulaire.

D'un autre côté, plusieurs études ont montré l'existence d'une voie d'activation d'Akt indépendante de la PI3K et des PIPs. Dans ce modèle d'activation Akt est activée par phosphorylation du résidu T³⁰⁸ de façon AMPc (Adénosine Monophosphate cyclique) dépendante. En effet, plusieurs agents éleveurs du taux d'AMPc (forskoline, chlorophenylthio-cAMP, prostaglandine E1 et 8-Bromo-cAMP) induisent l'activation d'Akt par activation de la PKA (Sable *et al.*, 1997; Filippa *et al.*, 1999). Dans ce modèle le domaine PH et la phosphorylation du résidu S⁴⁷³ ne sont pas nécessaire à l'activation d'Akt (Filippa *et al.*, 1999). Le mécanisme par lequel PKA active Akt n'est toujours pas connu.

4 - Les autres sites de phosphorylation d'Akt

a - Les résidus T⁴⁵⁰ et S¹²⁴

Il semble que les résidus T⁴⁵⁰ et S¹²⁴ d'Akt soient constitutivement phosphorylés. Ces phosphorylations ne semble pas jouer de rôle dans l'activation d'Akt (Alessi *et al.*, 1996b). La phosphorylation sur le site T⁴⁵⁰ ou au moins son maintien nécessite le domaine PH d'Akt, mais est PI3K indépendant (Bellacosa *et al.*, 1998).

b - Les Tyrosines

Dans la littérature on trouve quelques références à des tyrosines phosphorylées dans Akt. Ainsi, il a été décrit que la phosphorylation des résidus Y³¹⁵ et Y³²⁶ d'Akt1 par la tyrosine kinase c-Src, situées dans la boucle d'activation, est nécessaire à l'activation d'Akt1 suite à une stimulation par l'EGF (Epidermal Growth Factor) (Chen *et al.*, 2001b). D'autre part on a mis en évidence la phosphorylation d'Akt sur le résidu Y⁴⁷⁴ dans la lignée de carcinome Ovarien SKOV3 et les COS-7 en réponse au Pervanadate. Ces observations ont permis de relier Akt à la famille des tyrosines kinases Src. Cette phosphorylation semble être requise pour une activation complète d'Akt (Conus *et al.*, 2002; Jiang & Qiu, 2003).

III - Les modulateurs de l'activité d'Akt

A - Les phosphatases régulant l'activité d'Akt

1 - Les PI-Phosphatases : SHIP et PTEN

Comme nous venons de le voir, l'activation d'Akt nécessite la présence de PI(3,4,5)P₃ et PI(3,4)P₂ produits des PI3Ks de type I. Ainsi l'activité d'Akt peut être régulée en amont en régulant la quantité de PI(3,4,5)P₃ et PI(3,4)P₂ via les PI-Phosphatases PTEN et SHIP (page 42).

2 - Les Protéines Phosphatases

L'activité d'Akt étant intrinsèquement liée à ses phosphorylations, la régulation de son activité fait intervenir des protéines phosphatases. Comme pour les activités kinases PDK1 et PDK2, il semble que les déphosphorylations des sites T³⁰⁸ et S⁴⁷³ soient médiées par des phosphatases différentes. Ainsi, PP2A (Protein Phosphatase 2A) et PP2C α , 2 protéines phosphatases sont impliquées dans la déphosphorylation du résidu T³⁰⁸ d'Akt, mais pas dans celle de S⁴⁷³ (Andjelkovic *et al.*, 1996; Yoshizaki *et al.*, 2004; Ugi *et al.*, 2004). Alors que PHLPP (PH Leucine-rich repeat Protein Phosphatase) semble être spécifique de S⁴⁷³ (Gao *et al.*, 2005).

B - Les protéines interagissant et modulant l'activité d'Akt

Ces dernières années, de nombreuses interactions entre Akt et d'autres protéines non-substrat ont été mises en évidence. Ces interactions peuvent être classées en fonction de la région d'Akt qui interagit (Tableau 13, Figure 14). Parmi ces molécules certaines ont éveillé notre intérêt, TCL1 (T-Cell Leukemia 1), CTMP (C-Terminal Modulator Protein) et POSH (Plenty Of SH3).

Protéines	Fonctions	Références	
Domaine PH	TCL1	Augmente l'activité d'Akt <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i>	(Laine <i>et al.</i> , 2000)
	JIP1	Augmente l'activité d'Akt dans cellules 293	(Kim <i>et al.</i> , 2003)
	nRasGAP	Augmente la phosphorylation en S ⁴⁷³ induite par ILK	(Yang & Widmann, 2001; Yue <i>et al.</i> , 2004)
	Grb10	Augmente l'activation d'Akt en réponse aux facteurs de croissance	(Jahn <i>et al.</i> , 2002)
	IMPDH	?	(Ingley & Hemmings, 2000)
	Myosine II	?	(Tanaka <i>et al.</i> , 1999; Chung <i>et al.</i> , 2001)
Domaine Kinase	Hsp27	Augmente l'activation d'Akt en réponse à différents stress	(Rane <i>et al.</i> , 2003).
	Hsp90	Protège Akt de la dégradation et/ou de l'inactivation en formant un complexe avec Cdc37 Favorise l'interaction entre Akt et ces substrats (eNOS, ASK1, TERT)	(Basso <i>et al.</i> , 2002) (Sato <i>et al.</i> , 2000) (Fontana <i>et al.</i> , 2002) (Zhang <i>et al.</i> , 2005; Haendeler <i>et al.</i> , 2003)
	Trb3	Réduit les phosphorylations en T ³⁰⁸ et S ⁴⁷³ d'Akt	(Du <i>et al.</i> , 2003)
	APPL1	Augmente l'activation d'Akt2 en réponse à l'IGF1	(Yang <i>et al.</i> , 2003)
Domaine HM	CTMP	Réduit la phosphorylation en T ³⁰⁸ et S ⁴⁷³ d'Akt	(Maira <i>et al.</i> , 2001)
	Ft1	Augmente l'activation d'Akt, en favorisant l'interaction avec PDK1	(Remy & Michnick, 2004)
	APE	Augmente l'activation d'Akt	(Anai <i>et al.</i> , 2005)
	Src	Phosphoryles les résidus Y ³¹⁵ et Y ⁴²⁶ d'Akt	(Chen <i>et al.</i> , 2001a)
	POSH	L'interaction POSH-Akt inhibe l'activation de la JNK	(Figueroa <i>et al.</i> , 2003)
~	Kératine 10	Inhibe l'activité d'Akt en favorisant la séquestration au niveau du cytosquelette	(Paramio <i>et al.</i> , 2001; Santos <i>et al.</i> , 2002)

Tableau 13 : Les protéines interagissant avec Akt.

TCL1 est un proto-oncogène retrouvés dans de nombreuses leucémie B. Cette protéine de 14 kDa interagit avec le domaine PH d'Akt (Kunstle *et al.*, 2002; Laine *et al.*, 2000; Pekarsky *et al.*, 2000). Cette interaction fait intervenir un site différent du site d'interaction entre le domaine PH et les PIPs (Auguin *et al.*, 2004; French *et al.*, 2002). Il a été montré que TCL1 est capable d'augmenter l'activité d'Akt *in vivo* et *in vitro* (Laine *et al.*, 2000). TCL1 existe sous forme de dimères qui sont capable d'interagir avec Akt et de l'oligomériser (Kunstle *et al.*, 2002; Laine *et al.*, 2002). Les processus conduisant de l'interaction entre TCL1 et Akt ne sont pas encore clairs (Gold, 2003).

CTMP est une protéine de 22-26 kDa. CTMP interagit directement avec Akt à la membrane plasmique. Une surexpression de CTMP réduit la phosphorylation d'Akt sur les 2 sites (T³⁰⁸ et S⁴⁷³). Dans les cellules en migration CTMP est localisée dans les ruffles (Maira *et al.*, 2001). Récemment, il a été montré que dans certains glioblastomes l'expression de CTMP était réduite par des mécanismes de régulation de la transcription par méthylation du promoteur (Knobbe & Reifenberger, 2003).

L'extrémité C-terminale d'Akt contient 2 motifs **PxxP** capables de lier des protéines à domaines SH3. Parmi ces protéines, on trouve POSH est une scaffold protéine impliquée dans l'activation de la voie de signalisation pro-apoptotique JNK en créant un complexe POSH-MLK-MKK-JNK (Tapon *et al.*, 1998). C'est une molécule qui contient 2 paires de domaines SH3 séparés par un domaine riche en proline. Récemment, il a été montré que Akt2 peut interagir avec le 3ème SH3 de POSH et inhiber la voie JNK en déstabilisant le complexe POSH-MLK-MKK-JNK (Figuroa *et al.*, 2003).

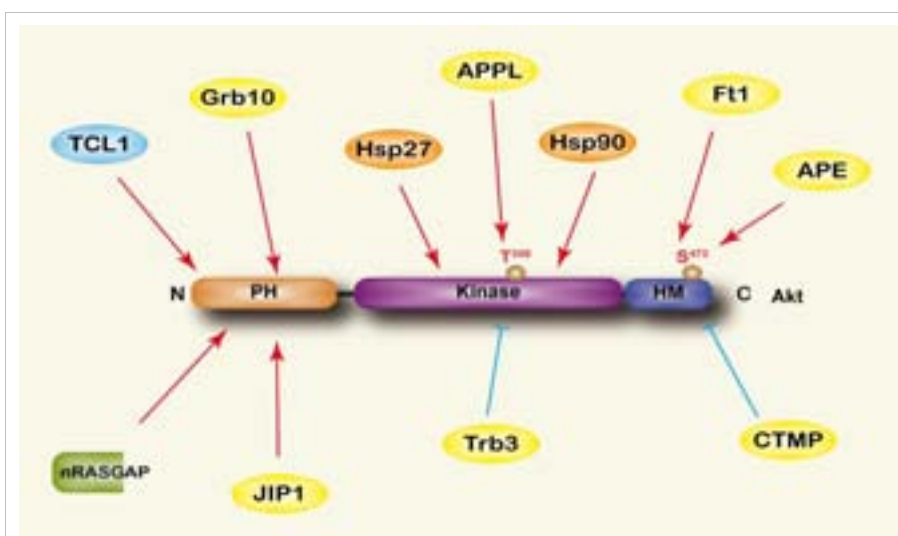


Figure 14 : Les protéines interagissant avec Akt.

C - Les inhibiteurs pharmacologiques d'Akt

La surexpression ou la suractivation de la kinase Akt sont impliquées dans de nombreux cancers (page 64), ce qui en fait une cible d'intérêt pour le développement d'inhibiteurs. Depuis quelques années le nombre d'inhibiteurs d'Akt s'est accru. Les inhibiteurs d'Akt peuvent être classés en plusieurs familles en fonction de leur mode d'action : les inhibiteurs de la liaison de l'ATP, les inhibiteurs allostériques, les analogues de PI (PIA) et les pseudosubstrats (Kumar & Madison, 2005). Les inhibiteurs de la liaison de l'ATP inhibent l'activité kinase d'Akt. Les inhibiteurs allostériques, bien que ne se fixant pas au niveau du domaine PH, nécessitent la présence de celui-ci pour inhiber Akt. Les analogues des PI sont des inhibiteurs compétitifs de la fixation d'Akt sur les PIPs. Et les pseudosubstrats, remplacent les substrats au sein du site actif d'Akt.

Composé	Spécificité		Commentaires	Références
	IC ₅₀ Akt1	IC ₅₀ (2)		
Site ATP				
NL-71-101	3.7 μM	9 μM (PKA)	Dérivé de l'inhibiteur de PKA H-89	(Reuveni <i>et al.</i> , 2002)
Analogues du Balanol	3	20 nM	1,9 μM (PKA)	(Breitenlechner <i>et al.</i> , 2005)
	4	40 nM	1.7 μM (PKA)	
A-443654	Ki=160 pM		Inhibent la phosphorylation de GSK3β induite par Akt	(Luo <i>et al.</i> , 2005b)
A-674563	Ki=11 nM			
Inhibiteurs Allostériques				
Akt1 selective	0.76 nM	24 μM (Akt2)	Dépendants du domaine PH Induisent l'apoptose dans les cellules LnCAP	(Barnett <i>et al.</i> , 2005)
Akt2 selective	21 μM	0.32 μM (Akt2)		
Akt½dual selective	0.15 μM	0.33 μM (Akt2)		
PIAs				
PIA5 PIA6 PIA23 PIA24 PIA25	5 μM	83 μM (PI3K)	Dépendants du domaine PH Induisent l'apoptose dans les cellules à fort taux d'Akt, mais peu d'effet sur les cellules à faible taux d'Akt	(Castillo <i>et al.</i> , 2004; Gills & Dennis, 2004)
Pseudosubstrats				
ARKRERTYSFGHH A VELDPEFEPRARE RTYAFGH	Ki =12 μM Ki=0,11 μM		Inhibition dose-dépendante de la phosphorylation de GSK3β et de la viabilité cellulaire	(Luo <i>et al.</i> , 2004)

Tableau 14 : Les inhibiteurs d'Akt

IV - Les fonctions d'Akt

A - Les substrats d'Akt

1 - Akt et le contrôle de l'apoptose

a - La régulation négative de protéines pro-apoptotiques

Bad est un membre de la famille des protéines Bcl-2 qui inhibe l'activité anti-apoptotique de Bcl2 et Bcl-X en se liant à eux (Downward, 1999). Akt phosphoryle le résidu

S¹³⁶ de Bad, cette phosphorylation inhibe les effets pro-apoptotiques de Bad en l'empêchant d'interagir avec Bcl-2 et Bcl-X au niveau de la mitochondrie et en favorisant son interaction avec les protéines 14-3-3 qui le séquestre dans le cytosol (del Peso *et al.*, 1997; Datta *et al.*, 1997).

La caspase 9 est une caspase initiateur et effectrice de l'apoptose (Donepudi & Grutter, 2002). Akt est capable de phosphoryler le résidu S¹⁹⁶ de la pro-caspase 9. Cette phosphorylation inhibe le clivage de la pro-enzyme inactive en enzyme active induit par le cytochrome c et l'adaptateur APAF1 (Cardone *et al.*, 1998).

Les SAPKs (Stress Activated Protein Kinase) sont des kinases activées en réponse à des stress ou des cytokines. Cette famille comprend 2 groupes de kinases appartenant à la famille des MAPKs, p38 et JNK (Johnson & Lapadat, 2002). Le rôle principal de ces kinases est l'induction de l'apoptose. Au moins 3 substrats d'Akt appartiennent aux voies d'activation des SAPKs, la phosphorylation de ces kinases induit une inhibition de leur activité entraînant la diminution de l'effet pro-apoptotique des SAPKs. Les 3 substrats en question sont des MKKK, ASK1 (Apoptosis Signal-regulating Kinase 1) en S⁸³ (Kim *et al.*, 2001a; Zhang *et al.*, 2005), MLK3 en S⁶⁷⁴ (Barthwal *et al.*, 2003) et SEK1/MKKK4 en S⁷⁸ (Park *et al.*, 2002; Murakami *et al.*, 2005). Parallèlement à ces substrats directement impliqués dans l'inhibition des SAPKs, il a été montré qu'Akt peut phosphoryler le résidu S⁷¹ de la GTPase Rac1, et que cette phosphorylation inhibe la liaison du GTP (Kwon *et al.*, 2000). Récemment cette phosphorylation a été mise en relation avec l'inhibition de la MLK3 via la dissociation du complexe POSH-MLK3-Rac1 (Zhang *et al.*, 2006).

b - La régulation positive de protéines anti-apoptotiques

PED/PEA-15 (Phosphoprotein Enriched in Diabetes/Astrocytes 15) est une protéine cytosolique qui exerce ces effets anti-apoptotiques en inhibant l'activité de la caspase 3 en réponse aux récepteurs de mort (Fas, TNF R (Tumor Necrosis Factor Receptor)) (Trencia *et al.*, 2003). Akt phosphoryle le résidu S¹¹⁶ de PED/PEA-15, cette phosphorylation protège la protéine de la dégradation (Trencia *et al.*, 2003). Cette phosphorylation de PED/PEA-15 peut aussi être effectuée par d'autres kinases comme CaMKII (Calmodulin dependant protein Kinase II) (Kubes *et al.*, 1998).

Ark5 appartient à la famille des AMPK (AMP Kinase), qui intervient dans l'inhibition de l'apoptose en inactivant les Caspase 8 et/ou 6. Akt phosphoryle Ark5 en S⁶⁰⁰ (Suzuki *et al.*, 2003b) en réponse à une déprivation en glucose ou à une stimulation des récepteurs de mort, cette phosphorylation induit l'activation de Ark5 (Suzuki *et al.*, 2003a; Suzuki *et al.*, 2004).

XIAP (X-linked Inhibitor of Apoptosis Protein) est un inhibiteur des caspases. Akt protège XIAP de la dégradation en phosphorylant le résidu S⁸⁷ (Dan *et al.*, 2004).

2 - Akt et les Facteurs de transcription qui régulent la survie

Akt régule aussi la survie cellulaire en intervenant dans le contrôle de la transcription de gènes pro- ou anti-apoptotiques.

a - La régulation négative de facteurs de transcription pro-apoptotiques

Les facteurs de transcription de la famille ForkHead ou FOXO sont impliqués dans la transcription de gènes codant principalement pour des protéines impliquées dans les voies pro-apoptotiques, tels que des ligands extracellulaires (Fas-Ligand, TRAIL (TNF Related Apoptosis-Inducing Ligand)) ou des molécules intracellulaires (TRADD (TNF Receptor type I Associated Death Domain), Bim (Bcl-2 interating mediator of cell death) ou Bcl-6) (Burgering & Medema, 2003). 4 FOXOs sont des substrats directs d'Akt : FKHR/FOXO1 (Rena *et al.*, 1999), FOXO2 (Wolfrum *et al.*, 2003), FKHLR1/FOXO3 (Brunet *et al.*, 1999) et AFX/FOXO4 (Kops *et al.*, 1999). Les sites de phosphorylation sont multiples, par exemple la T²⁴, la S²⁵⁶ et la S³¹⁹ pour FKHR/FOXO1 (Rena *et al.*, 1999). La phosphorylation de ces sites entraîne une diminution de l'activité transcriptionnelle par exclusion nucléaire et séquestration cytosolique des FOXOs par les protéines 14-3-3 (Biggs *et al.*, 1999; Brunet *et al.*, 1999).

YAP (Yes-Associated Protein) est un co-activateur de l'activité transcriptionnelle de p73. p73 appartient à la famille de p53 et induit la transcription de gènes pro-apoptotiques tel que Bax. La phosphorylation de YAP en S¹²⁷ induit sa relocalisation et sa séquestration dans le cytosol par les protéines 14-3-3, inhibant ainsi l'activité de p73 (Basu *et al.*, 2003).

Mdm2 (Murine double minute 2) est une Ubiquitine-E3-Ligase induite par le suppresseur de tumeur p53 et impliquée dans la dégradation de celui-ci (Shimizu & Hupp, 2003). Mdm2 est phosphorylée par Akt en S¹⁶⁶ et peut être en S¹⁸⁶ (Mayo & Donner, 2001; Zhou *et al.*, 2001b). Cette (ces) phosphorylation(s) jouent un rôle dans la localisation nucléaire de Mdm2 (Mayo & Donner, 2001), qui entraîne la dégradation de p53 (Zhou *et al.*, 2001b; Levav-Cohen *et al.*, 2005).

Les récepteurs des Androgènes (AR) sont des récepteurs cytosoliques de type facteurs de transcription activés par leurs ligands. AR est impliqué dans la régulation de gènes pro-apoptotiques et peut être phosphorylé par Akt en S²¹⁰ et S⁷⁹⁰ ce qui entraîne son inhibition (Lin *et al.*, 2001).

b - La régulation positive de facteurs de transcription anti-apoptotiques

Le facteur de transcription NF κ B est un facteur de croissance majeur dans la réponse immunitaire, principalement en induisant la transcription de gènes anti-apoptotiques tel que Bcl-X_L. Akt intervient dans la régulation de l'activité de NF κ B de manière directe et indirecte. Comme nous l'avons vu précédemment (page 27), NF κ B est constitutivement complexé à son inhibiteur I κ B α , dans le cytosol. Akt est capable d'induire l'activation de NF κ B en stimulant le complexe I κ K (I κ B Kinase) qui phosphoryle I κ B et induit sa dégradation, libérant NF κ B. Akt peut stimuler l'activité de I κ K en phosphorylant directement la sous-unité I κ K β en T²³ (Ozes *et al.*, 1999) et/ou en activant la kinase cot en amont de I κ K par phosphorylation en S⁴⁰⁰ (Kane *et al.*, 2002a). Enfin, Akt stimule directement l'activité transcriptionnelle de NF κ B en phosphorylant les résidu S⁵²⁹ et S⁵³⁶ de la sous-unité p65 (Madrid *et al.*, 2000; Madrid *et al.*, 2001).

CREB (Cyclic AMP Response Element Binding protein) est un facteur de transcription impliqué dans la régulation de gènes anti-apoptotiques, tels que Bcl-A ou Mcl-1 (Wang *et al.*, 1999). Akt phosphoryle CREB en S¹³³ ce qui entraîne une augmentation de l'activité transcriptionnelle de CREB et de son interaction avec son co-activateur CRB (Du & Montminy, 1998).

Les récepteurs des Œstrogènes (ER) sont des récepteurs cytosoliques de type facteurs de transcription activés par leurs ligands. ER induit la transcription de gènes impliqués dans la croissance et la survie, (Martin *et al.*, 2000). Les récepteurs ER peuvent être régulés d'une manière ligand-indépendante en réponse à des facteurs de croissance tels que l'IGF1 ou l'EGF (Martin *et al.*, 2000). Ainsi il a été montré qu'Akt est capable de phosphoryler ER sur les résidus S¹⁰⁴, S¹⁰⁶, S¹¹⁸ et S¹⁶⁷ et que ces phosphorylations induisent une augmentation de l'activité transcriptionnelle d'ER (Martin *et al.*, 2000).

3 - Akt et métabolisme

a - Le métabolisme des glucides

GSK3 β (Glycogen Synthase Kinase 3 β) est une kinase impliquée dans le métabolisme du glucose. Cette kinase inhibe la synthèse de glycogène en phosphorylant la glycogène-synthase (Embi *et al.*, 1980). Akt est capable de phosphoryler GSK3 β en position S⁹, inactivant l'activité kinase de GSK3 β en réponse à l'insuline. Cette inhibition de GSK3 β entraîne une activation de la glycogène-synthase (Cross *et al.*, 1995; van Weeren *et al.*, 1998).

Un autre aspect du métabolisme des glucides est la captation du glucose de l'extérieur vers l'intérieur de la cellule en réponse à l'Insuline dans les cellules musculaires et adipeuses.

Ce processus fait intervenir un transporteur de glucose membranaire, le GLUT4 (Glucose Transporteur 4). Ce transporteur cycle en permanence entre la membrane plasmique et un compartiment vésiculaire contenant le marqueur IRAP (Insulin-Responsive Amino Peptidase). Au repos, l'endocytose est plus rapide que l'exocytose, et GLUT4 est principalement stocké dans les vésicules IRAP/GLUT4 (Dugani & Klip, 2005). La stimulation de la cellule par l'insuline a pour effet majeur d'augmenter l'exocytose de GLUT4 (Dugani & Klip, 2005). La translocation de GLUT4 à la membrane plasmique en réponse à l'insuline est un mécanisme dépendant d'Akt. Au moins 2 de ses substrats sont impliqués, AS160 (Akt Substrate of 160 kDa) et PIKFyve (FYVE domain-containing PI₃P 5-Kinase). AS160 est une Rab GAP potentiellement phosphorylée sur 5 résidus, S³¹⁸, S⁵⁷⁰, S⁵⁸⁸, T⁶⁴² et T⁷⁵¹ (Kane *et al.*, 2002b; Bruss *et al.*, 2005). Au repos, AS160 est localisée au niveau des vésicules riche en GLUT4 (Peck *et al.*, 2006) et inhibe la translocation de GLUT4 à la membrane plasmique (Larance *et al.*, 2005) en inhibant les GTPases Rab (Rab2, Rab 8, Rab10 et/ou Rab14) (Miinea *et al.*, 2005). En réponse à l'insuline, AS160 est phosphorylée et inhibée par Akt (Sano *et al.*, 2003), ce qui augmente l'exocytose de GLUT4, mais pas son endocytose (Zeigerer *et al.*, 2004). L'autre substrat d'Akt intervenant dans le cycle de GLUT4 est PIKFyve. PIKFyve est une PI(3)P 5K activée par la phosphorylation du résidu S³¹⁸ par Akt (Berwick *et al.*, 2004). PIKFyve colocalise avec les vésicules GLUT4/IRAP et semble jouer un rôle dans le tri de ces vésicules à partir du compartiment endosomal (Berwick *et al.*, 2004).

La 6-PF2-K (6-phosphofructo-2-kinase) cardiaque stimule la glycolyse lorsqu'elle est phosphorylée par Akt en S⁴⁶⁶ (Deprez *et al.*, 1997; Marsin *et al.*, 2000).

PTP1B (Protein Tyrosine Phosphatase 1B) est un régulateur négatif de la signalisation de l'insuline qui agit en déphosphorylant le récepteur de l'insuline. Akt phosphoryle le résidu S⁵⁰ de PTP1B, ce qui a un effet inhibiteur sur son activité phosphatase (Ravichandran *et al.*, 2001; Giri *et al.*, 2004).

b - La synthèse des protéines

mTOR est une kinase qui intervient dans la régulation de la traduction en réponse aux nutriments et aux facteurs de croissance (Schmelzle & Hall, 2000). C'est dans ce 2^{ème} cas de figure qu'Akt induit l'activation de mTOR en phosphorylant le résidu S²⁴⁴⁸ en réponse à divers facteurs de croissance (Nave *et al.*, 1999). Une fois activée mTOR phosphoryle la p70^{S6K} et 4EBP1 (eIF4E Binding Protein-1), induisant une augmentation de la traduction (Nave *et al.*, 1999; Scott *et al.*, 1998; Crozier *et al.*, 2006).

Akt stimule l'activation de mTOR d'une manière indirecte en induisant la dégradation du complexe TSC1/2 (Tuberous Sclerosis Complex 1/2). Akt phosphoryle TSC2 en S⁹³⁹ et T¹⁴⁶²,

provoquant la dégradation du complexe inhibiteur de mTOR, TSC1/TSC2 (Inoki *et al.*, 2002; Cai *et al.*, 2006; Manning *et al.*, 2002), et permettant l'activation de celle-ci et la promotion de la traduction (Riemenschneider *et al.*, 2006).

c - Le métabolisme du NO

eNOS (endothelial Nitric Oxide Synthase) est une enzyme qui intervient dans le métabolisme du NO (Nitric Oxide) qui est un agent vasodilatateur majeur (Alderton *et al.*, 2001). Akt phosphoryle le résidu S¹¹⁷⁷ ce qui induit une activation de l'enzyme, une augmentation de la production de NO et une vasodilatation (Dimmeler *et al.*, 1999; Michell *et al.*, 1999).

d - La production de ROS

p47^{PHOX} NADPH oxydase joue un rôle important dans la production de ROS, impliqués dans la réponse immune innée des neutrophiles (Babior *et al.*, 2002; Chen *et al.*, 2003). Akt phosphoryle p47^{PHOX} sur 2 résidus, la S³⁰⁴ et la S³²⁸ (Babior, 2002). Ces 2 phosphorylations sont nécessaires à l'activation de p47^{PHOX} (Hoyal *et al.*, 2003).

e - Le métabolisme des nucléotides cycliques

La PDE3B (Phosphodiesterase 3B) est une enzyme qui contribue à la régulation des niveaux intracellulaires de nucléotides cycliques, tels que l'AMPc ou le GMPc. Akt induit l'activation de cette enzyme en phosphorylant le résidu S²⁷³ en réponse à l'insuline (Kitamura *et al.*, 1999; Komalavilas *et al.*, 2001; Ahmad *et al.*, 2000). Récemment, un nouveau substrat d'Akt, AS47 (Akt Substrate 47 kDa) (Gridley *et al.*, 2005), a été mis en évidence comme interagissant avec PDE3B (Chavez *et al.*, 2006).

4 - Akt, croissance et prolifération cellulaire

a - La régulation du cycle cellulaire

p21^{CIP} est un inhibiteur de cycline/CDK qui joue un rôle crucial dans la progression G₁/S du cycle cellulaire et la prolifération cellulaire (page 28). Akt phosphoryle p21^{CIP} en positions T¹⁴⁵ et S¹⁴⁶ (Li *et al.*, 2002b; Zhou *et al.*, 2001a). Les rôles de ces phosphorylations semblent être différents. La phosphorylation du résidu T¹⁴⁵ inhibe l'interaction entre p21^{CIP} et PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) ce qui entraîne la réplication de l'ADN et la prolifération cellulaire (Rossig *et al.*, 2001). Cette phosphorylation diminue l'affinité de p21^{CIP} avec les CDK 2 et 4, ce qui entraîne leur activation et la poursuite du cycle cellulaire (Li *et al.*, 2002b; Rossig *et al.*, 2001). Enfin, la phosphorylation du résidu T¹⁴⁵ de p21^{CIP} pourrait intervenir dans une relocalisation cytosolique de la protéine, mais sur ce point les études sont contradictoires (Zhou *et al.*, 2001a; Rossig *et al.*, 2001). La phosphorylation en S¹⁴⁶ semble avoir un rôle de stabilisation de la protéine (Li *et al.*, 2002b).

p27^{KIP1} est un autre inhibiteur de cycline/CDK est phosphorylé par Akt sur le résidu T¹⁵⁷ qui se trouve dans le signal de localisation nucléaire de la protéine. Cette phosphorylation inhibe la translocation nucléaire ce qui induit une augmentation de l'activité des complexe cycline/CDK et la poursuite du cycle cellulaire (Shin *et al.*, 2002; Liang *et al.*, 2002; Viglietto *et al.*, 2002). Récemment un autre site de phosphorylation par Akt a été mis en évidence dans des cellules issues de cancers du sein, la T¹⁹⁸, son rôle semble être le même que celui de la T¹⁵⁷ (Motti *et al.*, 2004).

b - La régulation de la longévité cellulaire

Les télomères sont des régions de l'extrémité des chromosomes dont la taille diminue à chaque mitose. Le raccourcissement des télomères entraîne, à partir d'un certain seuil, l'arrêt des divisions cellulaires (Furumoto *et al.*, 1998; Colgin & Reddel, 1999). La TERT (Telomerase Reverse Transcriptase) est la sous-unité catalytique du complexe Télomérase humaine (Greider & Blackburn, 1989; Greider, 1996; Nakamura & Cech, 1998). Il a été montré qu'Akt est capable de phosphoryler TERT, induisant une activation qui intervient dans la longévité des cellules et qui pourrait être un mode d'immortalisation des cellules (Breitschopf *et al.*, 2001). Récemment, il a été montré que l'activation de TERT nécessite la présence d'Hsp90 (Haendeler *et al.*, 2003).

B - Akt et Cancer

Comme nous l'avons vu dans le paragraphe précédant, Akt joue un rôle central dans de nombreux processus cellulaires qui, lorsqu'ils sont dérégulés, peuvent contribuer au développement ou à la progression de cancers (*Tableau 15*).

Caractéristiques des cellules Cancéreuses	Fonctions d'Akt
Indépendance vis à vis des facteurs de croissance	La surexpression ou la suractivation d'Akt peut entraîner une augmentation de la réponse aux facteurs de croissance
Insensibilité aux signaux antiprolifératifs	Inhibition de p53 via Mdm2, inhibition de p21 ^{CIP} et p27 ^{KIP} , inhibition des FOXOs
Inhibition de l'apoptose	Inactivation de Bad, Pro-Caspase 9, FOXO, activation de NFκB
Potentiel Réplicatif illimité	Augmentation de l'activité Télomérase via hTERT
Angiogénèse	Induit l'Angiogénèse via la production de NO par eNOS
Invasion et métastase	Contribue à l'invasion en luttant contre l'anoïkis et en stimulant la sécrétion de MMP

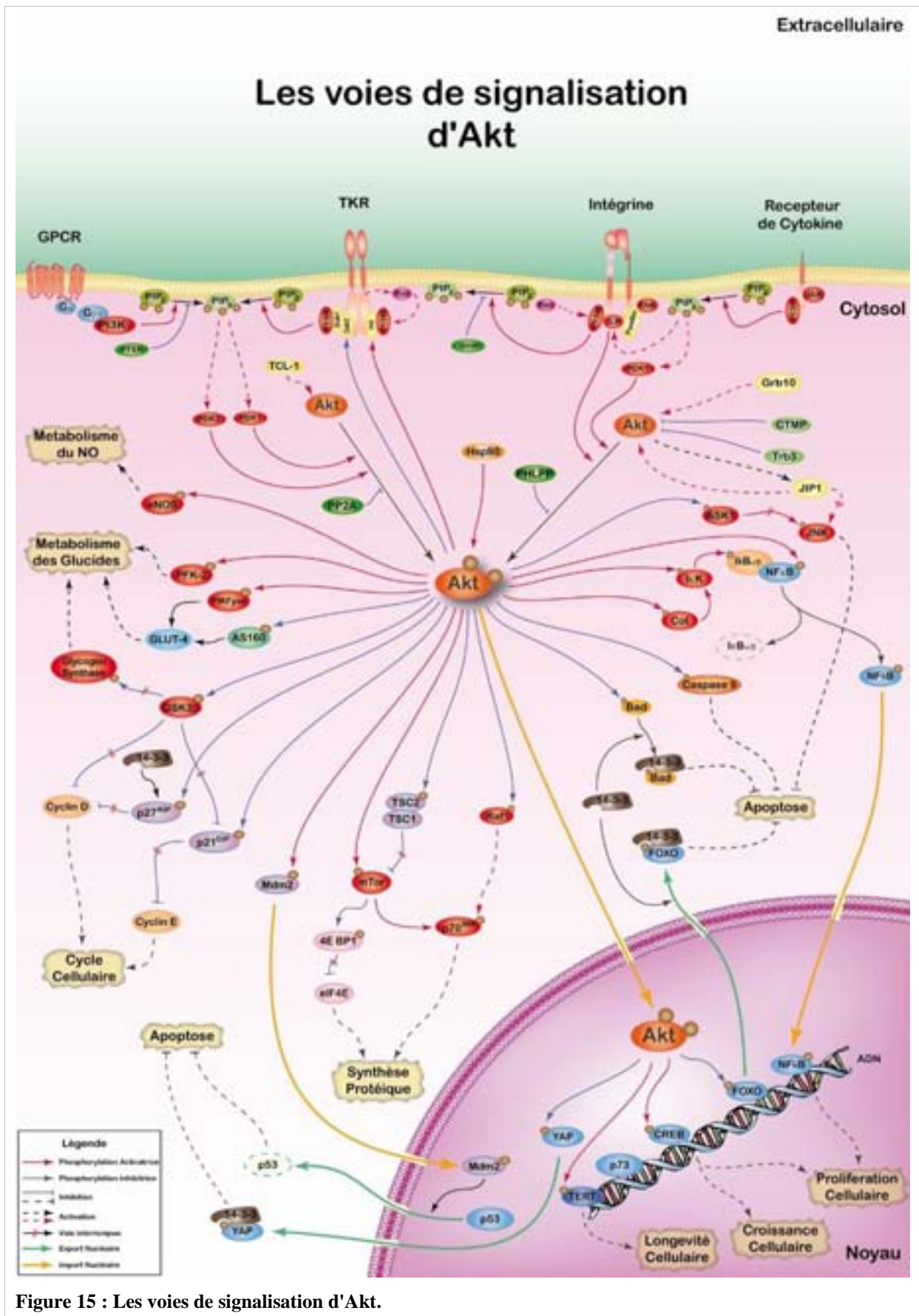
Tableau 15 : Akt intervient dans les processus impliqués dans le cancer (d'après (Fresno Vara *et al.*, 2004)).

L'implication d'Akt dans la biologie des cancers est un fait avéré, et de nombreuses altérations de la signalisation d'Akt interviennent dans ces processus.

La biologie d'Akt étant intrinsèquement liée à celle de PI3K, les premières altérations de la signalisation d'Akt mentionnées sont celles touchant la PI3K. Malgré le nombre de membres important de la famille des PI3Ks, un seul gène est impliqué dans des cancers, le gène *Pik3Ca* qui code pour la sous-unité p110 α de PI3K (page 35). *Pik3Ca* est muté dans près de 32% des cancers colorectaux (Samuels & Velculescu, 2004), 27% des glioblastomes (Hartmann *et al.*, 2005), 25% des cancers gastriques (Li *et al.*, 2005a), 36% des cancers hépatocellulaires (Lee *et al.*, 2005), 18 à 40% des cancers du sein (Wu *et al.*, 2005; Tao *et al.*, 2001), 4 à 12% des carcinomes ovariens (Wang *et al.*, 2005; Shayesteh *et al.*, 1999) (Ma *et al.*, 2000) et 4% des cancers du poumon (Samuels & Velculescu, 2004), ce qui fait de *Pik3Ca* le second gène le plus muté impliqués dans les cancers humains (l'autre étant le gène de la GTPase K-Ras) (Samuels & Ericson, 2006). Ces mutations entraînent une surexpression de p110 et/ou une augmentation de l'activité de la PI3K et d'Akt.

Actuellement, on ne connaît pas de mutations d'Akt impliqués dans des cancers, chez les mammifères, mais sa surexpression est fréquente. Ainsi, Akt2 est surexprimée dans près de 40% des cancers hépatocellulaires (Xu *et al.*, 2004), 57% des cancers colorectaux (Roy *et al.*, 2002), 32% des carcinomes pancréatiques (Altomare *et al.*, 2003) et 57% des adénomes (Roy *et al.*, 2002). La surexpression d'Akt1 a été mise en évidence dans 24% des cancers du sein (Stal *et al.*, 2003). Enfin, à ce jour, la surexpression d'Akt3 n'a pas été corrélée avec le cancer. Reproduite *in vitro*, la surexpression d'Akt2 est capable d'induire la transformation de fibroblastes. D'un autre côté, la surexpression d'une forme modifiée d'Akt pour localiser à la membrane (Myr-Akt) est capable d'induire la formation de tumeurs chez des souris « nude » (Sun *et al.*, 2001).

Outre la surexpression d'Akt, de nombreux cancers (carcinomes, glioblastome multiforme) présentent une activité Akt élevée qui est corrélée avec le développement de la maladie (Bellacosa *et al.*, 2005).



Section IV : La survie cellulaire

I - La survie : une inhibition de l'apoptose ?

A - Généralités

Dans les sections précédentes, nous avons déjà évoqué l'apoptose à de nombreuses reprises et il est temps de mieux définir ce terme. L'apoptose est un mécanisme de mort cellulaire actif finement régulé qui joue un rôle essentiel dans le développement, le maintien et le renouvellement tissulaire en éliminant les cellules en excès, endommagées ou infectées, potentiellement dangereuses pour l'organisme (Edinger & Thompson, 2004). Ce mécanisme aussi appelé « mort cellulaire programmée » est opposé au phénomène de « mort cellulaire accidentelle » (lors d'une blessure par exemple) qui aboutit à la nécrose (Majno & Joris, 1995). Les cellules en apoptose subissent une série d'évènements moléculaires conduisant à des altérations morphologiques caractéristiques (Wyllie *et al.*, 1980). Contrairement à la nécrose, l'apoptose ne déclenche pas de processus inflammatoire. La survie cellulaire est assurée par l'intégration de l'ensemble des signaux reçus par la cellule à un moment donné, à un endroit donné, dans un état donné. On peut classer ces signaux en 2 catégories, les signaux de survie (anti-apoptotiques) et les signaux de mort (pro-apoptotiques).

Les signaux de mort, sont très variés et peuvent être environnementaux (chocs thermiques, radiations ionisantes, agents cytotoxiques), mais ils peuvent aussi être liés à une signalisation spécifique qui stimule l'apoptose, la signalisation des récepteurs de la superfamille des récepteurs TNF-RI (Tumor Necrosis Factor Receptor Type I) aussi appelés récepteurs de mort. Ces 2 types de signaux aboutissent à l'activation de protéases spécifiques de l'apoptose, les caspases (Cysteine Aspartate Proteases). Les caspases sont synthétisées sous forme de précurseurs inactifs et s'activent en cascade. On distingue des caspases initiatrices et des caspases effectrices (Earnshaw *et al.*, 1999). Les caspases initiatrices peuvent être activées par 2 voies de signalisation faisant intervenir 2 types d'adaptateurs correspondant aux 2 types de signaux de mort précédemment décrit. La caspase 8 est activée par les récepteurs de mort via l'adaptateur FADD (FAS-Associated Death Domain protein) et la caspase 9 par une voie mitochondriale spécifique, associée aux stress cellulaires qui aboutit à la formation d'un complexe, l'apoptosome, contenant l'adaptateur APAF1 (Apoptotic Protease Activating Factor 1) et le cytochrome c (Hengartner, 2000). Ces 2 caspases initiatrices sont capables d'activer par clivage les caspases effectrices (3/6/7) qui vont cliver de nombreuses protéines entraînant la plupart des évènements morphologiques, structuraux ou biochimiques de l'apoptose (Earnshaw *et al.*, 1999). Parmi ces substrats on trouve des composants du cytosquelette (actine, caténines, lamines, kératines,...), des protéines impliquées dans le métabolisme et la

réparation de l'ADN (PARP, ARN polymérase I,...), des protéines impliquées dans la transduction du signal (Akt, PKC, MAPK, NF κ B,...), des protéines impliquées dans le cycle cellulaire (p27^{Kip1}, pRB...) et des protéines intervenant dans l'apoptose (caspases, famille Bcl-2, IAP,...) (Degtarev *et al.*, 2003).

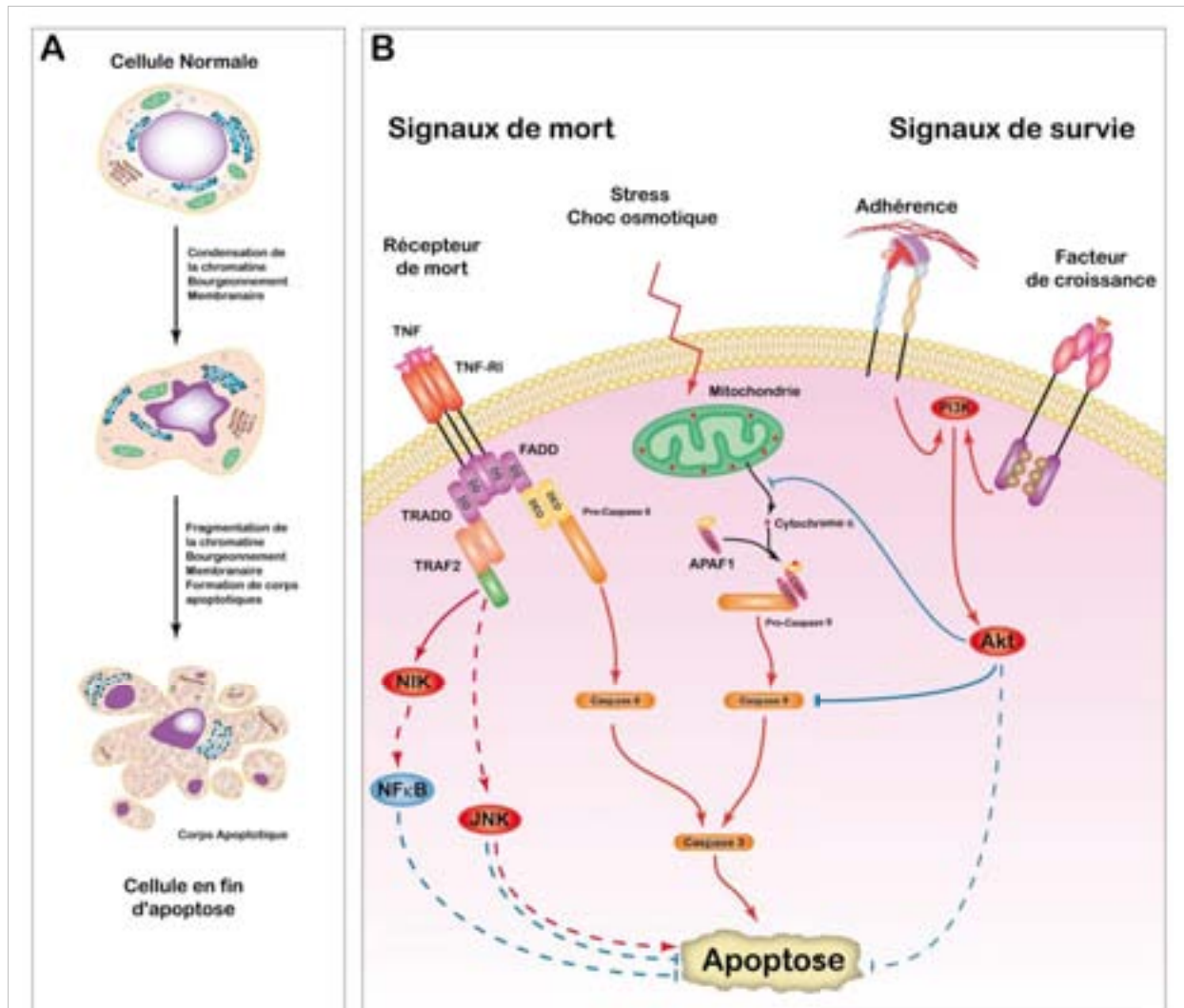


Figure 16 : L'apoptose. (A) Lors de l'apoptose la membrane plasmique commence par bourgeonner, puis le noyau se condense, et l'ADN et les organites sont dégradés. L'ensemble de ces phénomènes s'accompagne d'un rétrécissement cellulaire qui aboutit à la formation de corps apoptotiques dont la membrane est intacte et qui sont éliminés par phagocytose (Lodish, 2004). (B) Les signaux de mort induisent une signalisation particulière. Ainsi, après fixation de son ligand, le récepteur de mort se trimérise et entraîne une modification de conformation du domaine DD (Death Domain) qui permet le recrutement de l'adaptateur FADD (FAS associated protein with DD). Une fois fixé au récepteur, FADD s'associe à la pro-caspase 8 et induit son activation par clivage interne. La voie de signalisation apoptotique mitochondriale débute par une diminution du potentiel de membrane mitochondriale qui s'accompagne de l'ouverture de mégapores (Zornig *et al.*, 2001). Cette ouverture est responsable de la libération du cytochrome c dans le cytosol et de la formation avec la protéine adaptatrice APAF-1 et la pro-caspase 9 d'un complexe protéique, l'apoptosome. Une fois activées, les caspases 8 et 9 clivent et activent les caspases effectrices (caspases 3/6/7) qui entraînent l'activation de programmes conduisant à la mort cellulaire par apoptose (Zou *et al.*, 1999).

Les signaux de survie peuvent être regroupés de manière simplifiée en 2 ensembles, les signaux liés au phénomène d'adhérence (cellule-cellule et cellule-matrice) et les signaux liés aux facteurs de croissance et cytokines présents dans l'environnement. Ces signaux activent des voies de signalisation qui inhibent l'apoptose telle que les voies NFκB ou PI3K/Akt décrites précédemment. Dans cette section, nous allons explorer les mécanismes d'adhérence et leurs implications dans la survie cellulaire.

II - Adhérence et survie cellulaire

A - Généralités

La plupart des cellules de l'organisme forment des tissus et des organes en établissant des interactions entre elles et avec leur environnement, la matrice extracellulaire (MEC). Les mécanismes de ces adhérences cellule-cellule et cellule-matrice font intervenir un ensemble de protéines exprimées à la surface des cellules que l'on regroupe sous le nom de molécules d'adhérence (Petruzzelli *et al.*, 1999). Les molécules d'adhérence ne sont pas que des protéines membranaires possédant seulement des capacités d'interactions avec d'autres molécules, mais constituent des récepteurs des signaux de l'environnement des cellules (la MEC et les autres cellules). Ces molécules sont reliées à de nombreuses fonctions cellulaires telles que l'organisation du cytosquelette, la migration, la prolifération, mais aussi à des fonctions plus spécifiques associées à certains types cellulaires telles que la diapédèse des leucocytes, les synapses immunologiques, neuronerveuses ou neuromusculaires et bien entendu à la survie cellulaire. Des processus fondamentaux comme la fécondation, l'embryogénèse, la morphogénèse, la structuration et la réparation tissulaire sont dépendants des phénomènes d'adhérence.

Les molécules d'adhérence forment un groupe de protéines très hétérogène divisé en plusieurs familles en fonction de leurs similitudes structurales : les Cadhérines, les Sélectines, la superfamille des Immunoglobulines (Ig), les RPTPs (Receptor Protein Tyrosine-Phosphatase), les intégrines et les récepteurs du hyaluronate (Freemont, 1998). Les 3 premières familles interviennent dans l'adhérence cellule-cellule et la dernière intervient dans l'adhérence cellule-MEC. Les Intégrines, quant à elles, jouent un rôle prépondérant dans l'adhérence cellule-MEC, mais peuvent aussi intervenir dans certaines interactions cellule-cellule.

B - Les molécules intervenant dans l'adhérence cellule-cellule

Les cellules ont besoin les unes des autres, elles développent des interactions cellule-cellule dans 2 buts principaux : former et coordonner la fonction de différents groupes de cellules, et empêcher ou arrêter la migration cellulaire (Freemont, 1998). Les molécules

impliquées dans les interactions cellule-cellule peuvent interagir avec des molécules de même type, interactions homophiliques ou de types différents, interactions hétérophiliques.

1 - Les cadhérines

Les cadhérines sont des protéines transmembranaires caractérisées par la répétition d'un domaine protéique d'une centaine de résidus possédant un site de liaison au Ca^{2+} dans leur partie extracellulaire (Gumbiner, 1996; Yap *et al.*, 1997) (Figure 17). Le Ca^{2+} joue un rôle crucial dans le maintien de l'intégrité structurale de la protéine (Ringwald *et al.*, 1987). Les cadhérines sont les composants majeurs de structures d'adhérence cellule-cellule importantes dans la polarisation de certains tissus tels que les épithéliums. Ces structures sont les jonctions adhérentes (zonula ou macula), les jonctions serrées (tight junctions) en relation avec le cytosquelette d'actine et les desmosomes en relation avec les filaments intermédiaires. La famille des cadhérines se compose de plusieurs sous-familles dont les plus importantes sont les cadhérines « classiques » et les cadhérines desmosomales.

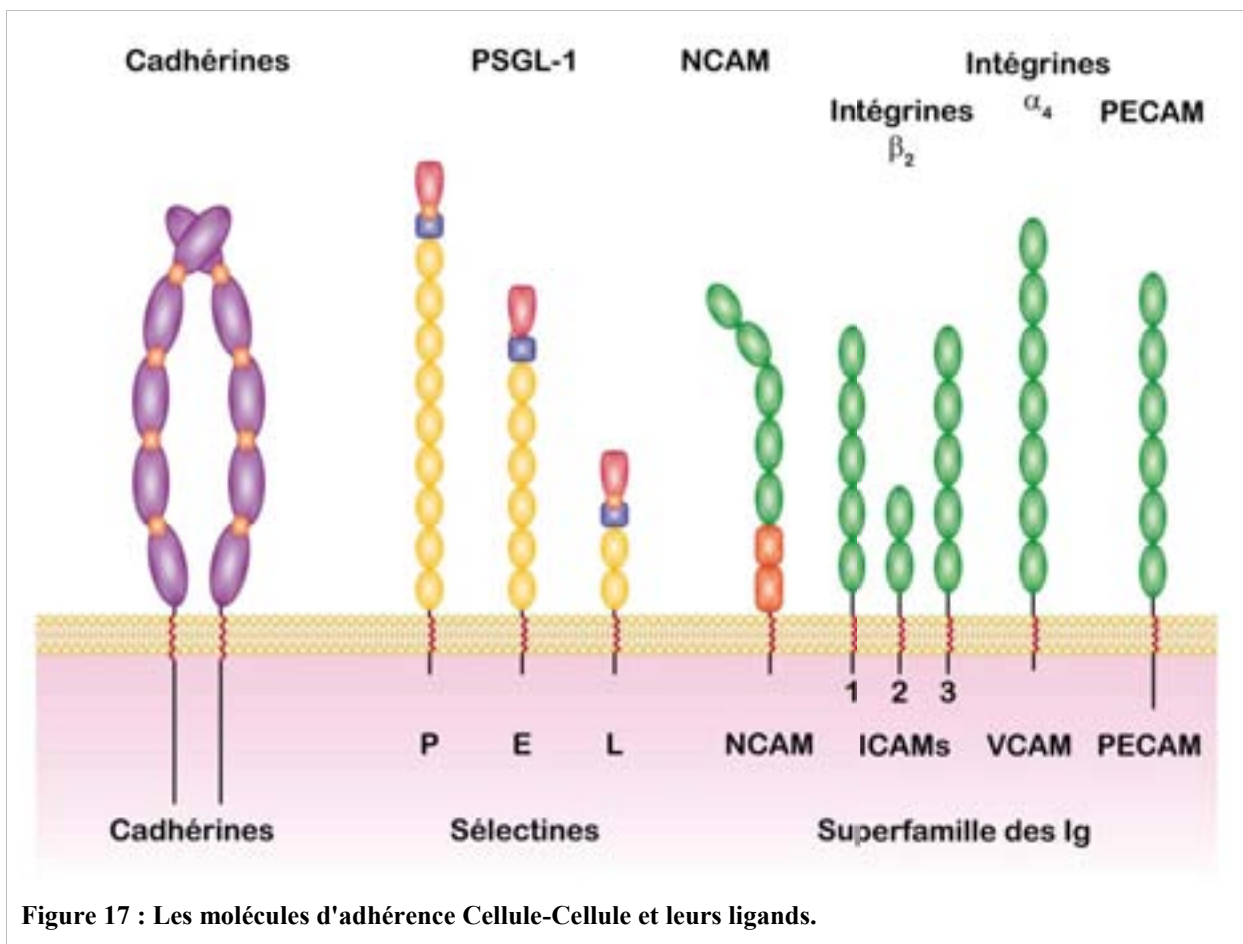


Figure 17 : Les molécules d'adhérence Cellule-Cellule et leurs ligands.

2 - Les sélectines

Les sélectines sont des molécules d'adhérences impliquées dans les interactions entre les leucocytes (Lymphocytes, Macrophages,...) ou les plaquettes et les cellules endothéliales (paroi des vaisseaux sanguins). Contrairement au cadhérines, elles interviennent dans interactions relativement faibles et labiles (Cross *et al.*, 1995). Cette famille comprend 3 membres nommés en fonction du type cellulaire qui les expriment majoritairement, la sélectine E (CD62E (Endothéliale)), la sélectine L (CD62L (Lymphocytaire)) et la sélectine P (CD62P (Plaquettes)).

Les sélectines sont des monomères possédant un domaine extracellulaire N-terminal, constitué d'un domaine lectine Ca^{2+} -dépendant, d'un domaine EGF-Like et de plusieurs répétitions d'un domaine CRP (Complement Regulatory Protein) aussi appelé domaine sushi, suivi d'un domaine transmembranaire et d'une courte région C-terminale intracellulaire (Carlos & Harlan, 1994). C'est le domaine lectine qui leur confère la spécificité pour leurs ligands qui sont des glycoprotéines présentant une structure particulière : sialyl-lewis^X que l'on retrouve, par exemple dans les antigènes des groupes sanguins (Zak *et al.*, 2000; Springer, 1994; Carlos & Harlan, 1994) (*Figure 17*).

3 - La superfamille des Ig

La superfamille des Ig regroupent des protéines très hétérogènes qui ont en commun de posséder au moins un domaine d'homologie avec les Ig (motif Ig-Like) dans leur région extracellulaire. Le domaine Ig-like est un domaine globulaire constitué de 2 cystéines séparées par une soixantaine de résidus, qui forment un pont disulfure (Springer, 1990). Souvent, les membres de cette famille possèdent également une ou plusieurs copies du domaine fibronectine de type III, FN III (Fibronectin type III repeat) (*Figure 17*). Ces molécules possèdent une portion transmembranaire unique et une portion cytoplasmique relativement réduite. Les membres de la superfamille des Ig interviennent dans des interactions homophiliques (NCAM-NCAM) ou hétérophiliques (ICAM-Intégrines) de manière indépendante du Ca^{2+} . Elles sont principalement régulées par expression en réponse à des cytokines (van de Stolpe & van der Saag, 1996).

4 - Les RPTPs

Les RPTPs sont impliqués dans la signalisation et la régulation de l'adhérence cellule-cellule. Contrairement aux autres molécules d'adhérence les RPTPs possèdent une activité enzymatique de type tyrosine phosphatase, localisée dans leur partie cytoplasmique. Ces molécules peuvent interagir de manière homophile (RPTP-RPTP) ou hétérophilique (principalement avec des membres de la superfamille des Ig) (Beltran & Bixby, 2003).

C - Les molécules intervenant dans l'adhérence cellule-matrice

1 - La matrice extracellulaire

La matrice extracellulaire (MEC) représente l'ensemble des molécules qui « remplissent » les espaces intercellulaires. La MEC possède des propriétés physico-chimiques caractéristiques : certaines MECs sont très rigides comme les cartilages et l'os, d'autres sont souples comme les tissus conjonctifs. Ces propriétés physiques sont l'image de leur composition et de leur organisation, qui rendent compte des fonctions des cellules qui y adhèrent. Certaines cellules sont spécialisées dans la production de cette matrice, par exemple, les fibroblastes qui construisent l'essentiel des tissus conjonctifs ou les chondroblastes qui élaborent le cartilage hyalin. Les MECs sont composées de protéines fibreuses (collagènes, élastine), de GAG (GlycoAminoGlycanes) et protéoglycanes, et de glycoprotéines de structure (Lodish, 2004) (Figure 18).

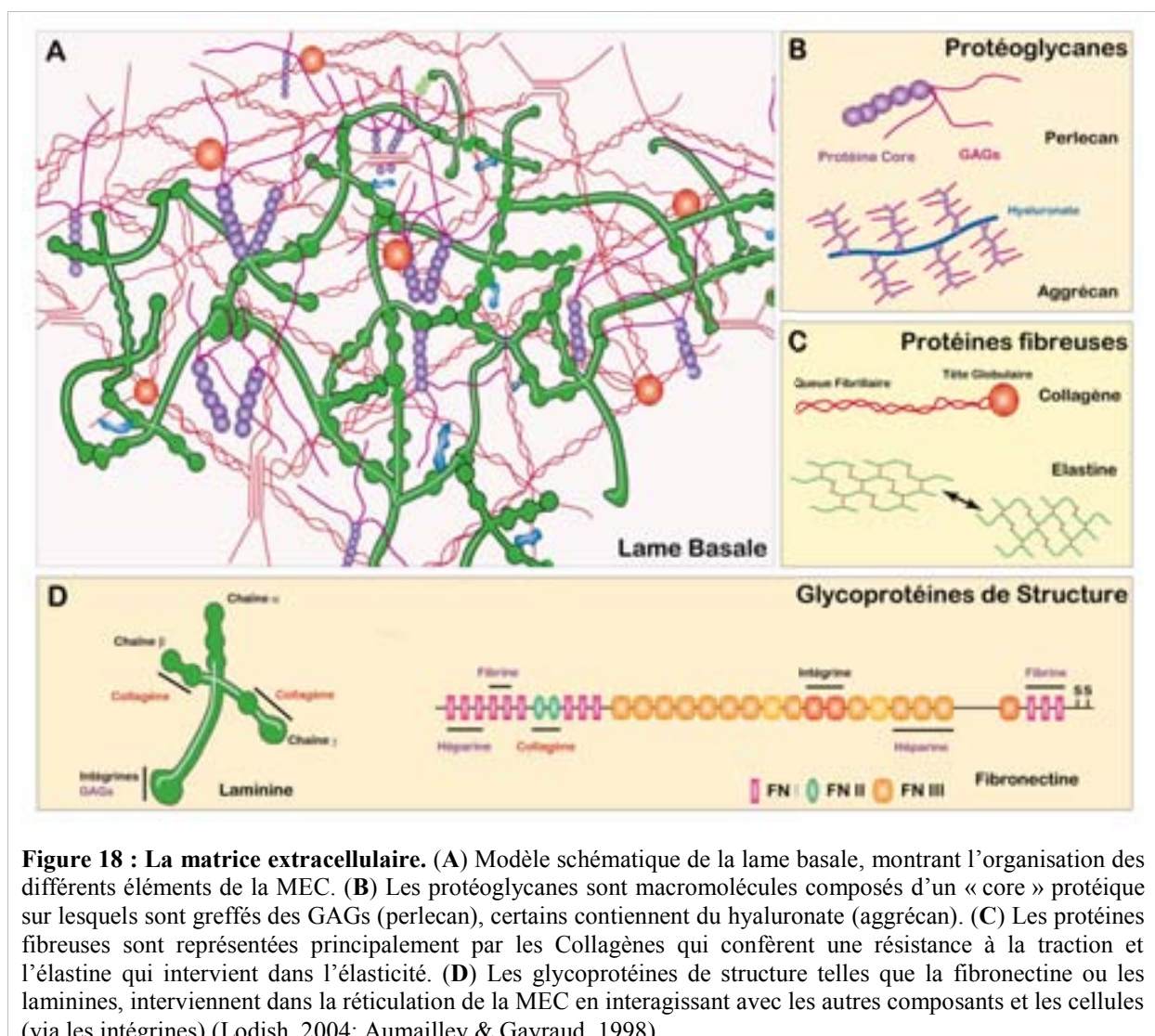


Figure 18 : La matrice extracellulaire. (A) Modèle schématique de la lame basale, montrant l'organisation des différents éléments de la MEC. (B) Les protéoglycanes sont macromolécules composés d'un « core » protéique sur lesquels sont greffés des GAGs (perlecan), certains contiennent du hyaluronate (aggrécane). (C) Les protéines fibreuses sont représentées principalement par les Collagènes qui confèrent une résistance à la traction et l'élastine qui intervient dans l'élasticité. (D) Les glycoprotéines de structure telles que la fibronectine ou les laminines, interviennent dans la réticulation de la MEC en interagissant avec les autres composants et les cellules (via les intégrines) (Lodish, 2004; Aumailley & Gayraud, 1998).

2 - Les intégrines

a - Généralités

Les intégrines sont des glycoprotéines transmembranaires hétérodimériques. Les 2 sous-unités, α et β , sont liées de manière non-covalente. Comme leur nom le sous-entend, les intégrines font l'intégration entre la machinerie intracellulaire (cytosquelette, kinases,...) et l'environnement extracellulaire (cellule ou matrice) (Springer, 1994; Hynes, 1992). Les intégrines forment une famille structurellement et fonctionnellement très différente des autres molécules d'adhérence. La caractéristique la plus notable des intégrines est, qu'outre leur capacité à transmettre des signaux de l'extérieur vers l'intérieur de la cellule (signalisation « outside-in »), elles peuvent être activées par des signaux intracellulaires qui modulent leur capacité de liaison pour leur ligand (signalisation « inside-out ») (Shimaoka *et al.*, 2002).

b - Structure

Il existe au moins 8 sous-unités β et 18 sous-unités α qui peuvent former 25 intégrines hétérodimériques $\alpha\beta$ (Humphries, 2000). C'est la combinaison $\alpha\beta$ qui donne la spécificité de l'intégrine pour son substrat (Hynes, 1992) (*Figure 19*). Les sous-unités α et β sont donc des glycoprotéines transmembranaires possédant une région extracellulaire N-terminale, un domaine transmembranaire et un court domaine cytoplasmique. Les régions extracellulaires des sous-unités α (≈ 1000 résidus) et β (≈ 700 résidus) des intégrines sont constituées d'une « Tête » globulaire et d'une « Tige » (stalk).

La « Tête » des sous-unités α est constituée de 7 motifs FG-GAP (Phe/Gly-Gly/Ala/Pro) qui forment une hélice appelée, hélice- β (β -propeller) (Springer, 1997). Les motifs FG-GAP 5, 7 et parfois 4 contiennent des sites de liaison au Ca^{2+} (Oxvig & Springer, 1998). C'est dans cette structure en hélice que se trouve les résidus impliqués dans la liaison des ligands (Kamata *et al.*, 2001). De plus, pour 9 des 18 sous-unités α connues, un domaine I (ou domaine αA) est présent entre les motifs FG-GAP 2 et 3. Ce domaine, quand il est présent, est le site principal de liaison des ligands (Diamond *et al.*, 1993). Cette interaction est réalisée grâce à son domaine MIDAS (Metal Ion-Dependent Adhesion Site) qui est un site de liaison pour les cations divalents (Mg^{2+} , Ca^{2+}) qui permet les interactions avec les résidus chargés négativement des ligands (Michishita *et al.*, 1993; Huang *et al.*, 1995). La « Tige » des sous-unités α est constituée d'un domaine Thigh (« cuisse ») et 2 domaines Calf (« mollet ») (Xiong *et al.*, 2003).

La « Tête » des sous-unités β est constituée d'un domaine PSI (Plexins Semaphorins Integrins) riche en cystéine qui intervient dans le maintien des intégrines dans une

conformation inactive (Zang & Springer, 2001). A la suite du domaine PSI, se trouve un domaine de 240 résidus ressemblant au domaine I appelé, domaine I-like (ou domaine β A). Ce domaine est responsable des interactions $\alpha\beta$ (Xiong *et al.*, 2001) et intervient dans la liaison du ligand (directement dans les intégrines sans domaine I et indirectement dans les Intégrines avec domaine I) (Shimaoka *et al.*, 2002). Enfin la « Tige » des sous-unités β est constituée principalement de 4 domaines riche en cystéine de type EGF-like et d'une région appelée β -tail.

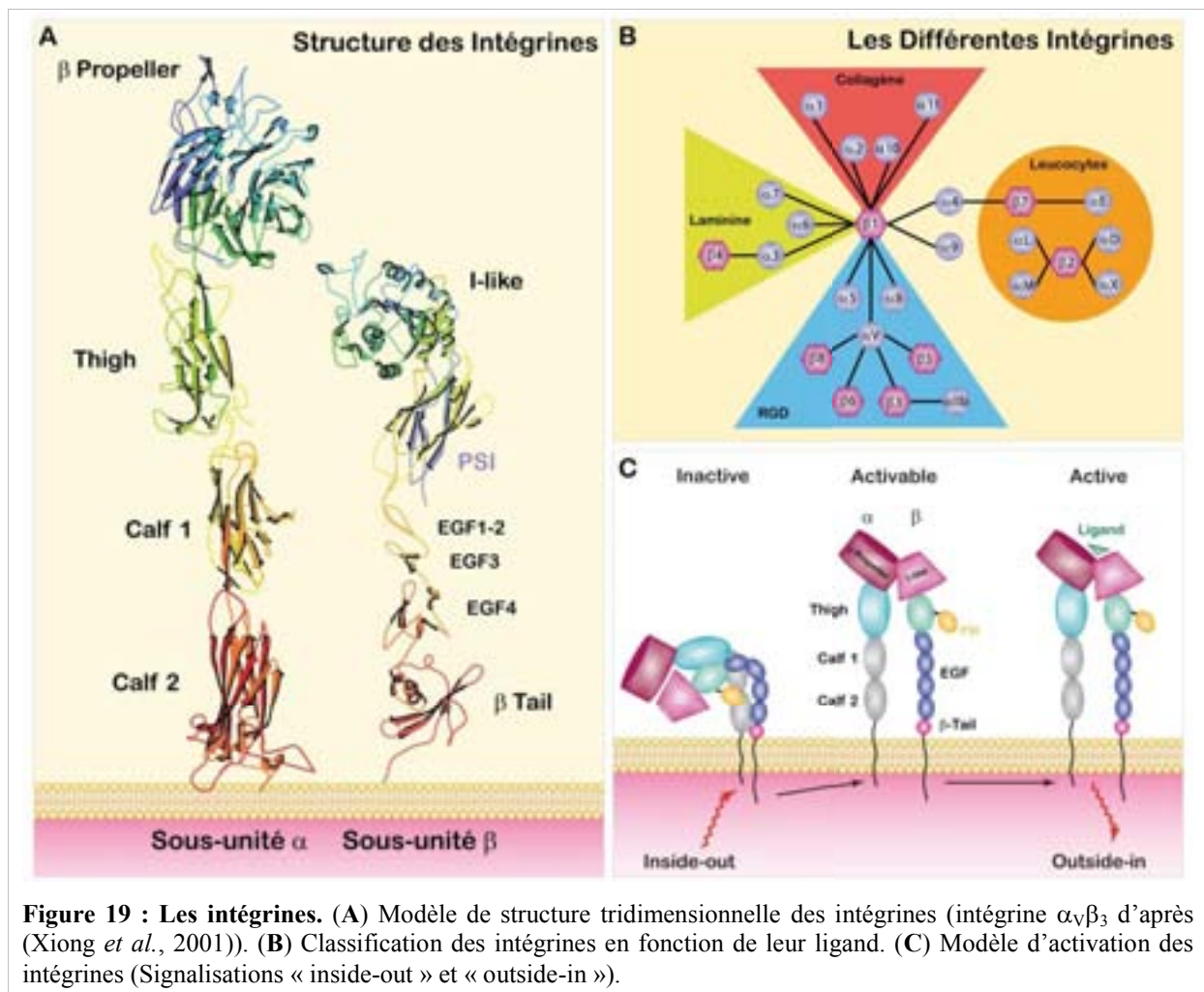


Figure 19 : Les intégrines. (A) Modèle de structure tridimensionnelle des intégrines (intégrine $\alpha_V\beta_3$ d'après (Xiong *et al.*, 2001)). (B) Classification des intégrines en fonction de leur ligand. (C) Modèle d'activation des intégrines (Signalisations « inside-out » et « outside-in »).

c - Ligands et activation : signalisation « outside-in » et « inside-out »

Les intégrines sont les principales molécules d'adhérence cellule-matrice et parmi leurs ligands on retrouve les glycoprotéines composant la MEC, la fibronectine, les collagènes, les Laminines, etc., mais elles interviennent aussi dans l'adhérence cellule-cellule en se liant à certains membres de la superfamille des Ig. La plupart des intégrines reconnaissent leur ligand via une séquence peptidique de type RGD (Arg/Gly/Asp). Cependant, toutes les protéines

contenant une séquence RGD ne sont pas forcément reconnues par une intégrine. En général, les intégrines peuvent interagir avec plusieurs ligands distincts, mais certaines ne peuvent en lier qu'un seul. Dans certains cas 2 intégrines peuvent lier le même ligand mais sur des sites différents.

Les études sur la structure tridimensionnelle des intégrines suggèrent qu'à l'état de repos, la portion extracellulaire est repliée avec la « Tête » de l'intégrine près de la membrane. Suite à l'activation, les portions juxta-membranaires des sous-unités se déplacent, ce qui amène la « Tête » de l'intégrine à se redresser et à exposer de nouveaux épitopes permettant (ou améliorant) la fixation de nouveaux ligands (Takagi & Springer, 2002).

Les intégrines ne possèdent pas d'activité enzymatique intrinsèque. Lorsqu'une intégrine se lie avec son ligand, elle s'oligomérisse et recrute différents adaptateurs, protéines de structure et kinases qui vont transduire un signal dans la cellule, c'est ce que l'on appelle la signalisation « outside-in ». La signalisation induite par la combinaison ligand/intégrine est spécifique du couple ligand/intégrine impliqué (Giancotti, 2000). Par exemple, l'intégrine $\alpha_2\beta_1$ engagée avec une matrice de collagène, active la MAPK p38, qui induit la transcription du gène de collagène de type I (Ivaska *et al.*, 1999).

L'interaction entre les intégrines et leurs ligands dépend de 2 éléments, la force de l'interaction entre l'intégrine et son ligand (affinité), et le nombre d'intégrines engagées avec le ligand (avidité). Une augmentation de l'avidité se définit comme une augmentation de la force de l'adhérence de la cellule, qui peut être induit par une oligomérisation des intégrines plutôt que par une augmentation d'affinité de celles-ci. L'affinité et l'avidité des intégrines peuvent être modulées par différents signaux intracellulaires, qui amèneront la liaison de différentes protéines au domaine cytoplasmique et un changement de conformation de l'intégrine. C'est la signalisation « inside-out » (Shimaoka *et al.*, 2002). Par exemple, la signalisation des intégrines est intimement liée au cytosquelette d'actine. En effet, la réorganisation du cytosquelette induite par l'engagement des intégrines pourra favoriser l'oligomérisation de celles-ci (Giancotti & Ruoslahti, 1999).

d - La signalisation des Intégrines

Les régions cytoplasmiques des sous-unités α et β des intégrines sont capables d'interagir avec de nombreuses molécules impliquées dans la signalisation et la régulation des intégrines. On peut classer ces protéines en 3 catégories : les protéines qui se lient à l'actine, les protéines impliquées dans la signalisation cellulaire et les autres (Tableau 16). Parmi les protéines impliquées dans la signalisation cellulaire on trouve, les kinases FAK et ILK, des adaptateurs tels que Grb2, ainsi que des GEFs de Arf. Ces protéines permettent entre autre,

l'activation de la voie des MAPKs, de la voie PI3K/Akt et de plusieurs GTPases monomériques.

Protéine	SU	Fonction	Références
Cytosquelette	Taline	β	Lien direct ou non (via vinculine) entre les intégrines et le cytosquelette d'actine dans les adhérences focales (Horwitz <i>et al.</i> , 1986; Pfaff <i>et al.</i> , 1998)
	α -Actinine	β	Formation des fibres de stress en réponse aux forces de cisaillements (Pavalko <i>et al.</i> , 1998)
	Filamines	β	
	p27BBP	β_4	Association aux filaments intermédiaires (Biffo <i>et al.</i> , 1997)
	Plectine	β_4	
Signalisation	FAK	β	Tyrosines kinase des adhérences focales Interagit aussi avec la paxilline et la taline (Tahiliani <i>et al.</i> , 1997; Shen & Schaller, 1999)
	ILK	β	Modulation de la liaison intégrine/cytosquelette d'actine (Hannigan <i>et al.</i> , 1996)
	Grb2	β	Adaptateur de la voie des MAPKs (Law <i>et al.</i> , 1996)
	Paxilline	α	Régulation de la liaison du cytosquelette et de FAK (Liu & Ginsberg, 2000; Liu <i>et al.</i> , 2001b)
	ICAP1	β	Régulateur négatif des Intégrines Rôle de GDI pour Rac et Cdc42 (Bouvard <i>et al.</i> , 2003; Zhang & Hemler, 1999; Degani <i>et al.</i> , 2002)
	Rack-1	β	Lien avec les PKC activées (Liliental & Chang, 1998)
	Cytohesine-1	β_2	Augmente l'adhérence de $\alpha_1\beta_2$ à ICAM GEF d'Arf (Kolanus <i>et al.</i> , 1996)
	Cavéoline	α	Signalisation vers ERK (MAPK) (Wary <i>et al.</i> , 1998)
Autres	Endonexine	β_3	Modulation de l'affinité (Shattil <i>et al.</i> , 1995)
	Mélusine	β_1	Régulée par le Ca^{2+} dans le muscle (Brancaccio <i>et al.</i> , 1999)
	CD98	β	Modulation de l'affinité (Zent <i>et al.</i> , 2000; Cai <i>et al.</i> , 2005)
	CIB	$\alpha_{11\beta}$	Potentiellement, modulation de l'affinité (Barry <i>et al.</i> , 2002)
	Nischarine	α_5	Inhibition de la migration cellulaire (Alahari <i>et al.</i> , 2000)
	Calréticuline	α	Régule les fonctions du Ca^{2+} (Coppolino <i>et al.</i> , 1997)

Tableau 16 : Les protéines interagissant avec les Intégrines.

FAK est une tyrosine kinase associée aux structures d'adhérences. Les interactions entre les intégrines et FAK peuvent être directes (sous-unités β) ou indirectes (via la paxilline ou la taline) (Tahiliani *et al.*, 1997; Shen & Schaller, 1999). L'engagement des intégrines avec leurs ligands induit l'auto-phosphorylation de FAK sur le résidu Y³⁹⁷ (Schaller *et al.*, 1994). Cette activation de FAK induit le recrutement de nombreux adaptateurs ou régulateurs, dont des protéines à domaines SH2 telles que Shc, Grb2 (Schlaepfer & Hunter, 1997), p85 (Reiske *et al.*, 1999) et PLC γ (Zhang *et al.*, 1999), des protéines à domaines SH3 telle que p130^{CAS} (Harte *et al.*, 1996) et enfin, la paxilline (Hildebrand *et al.*, 1995) et la taline (Chen *et al.*, 1995) via une séquence de ciblage spécifique des adhérences focales, la séquence FAT (Focal Adhesion Targeting). La FAK peut activer de nombreuses GEFs des Rho GTPases, tel que DOCK180 via le complexe p130^{CAS}/Crk/DOCK180 (Rac1) (Kiyokawa *et al.*, 1998) ou la

GEF PIX via la génération de PI(3,4,5)P₃ par la PI3K (Rac1 et Cdc42) (Turner *et al.*, 1999; Zhao *et al.*, 2000).

ILK se fixe sur le domaine cytoplasmique des sous-unités d'intégrines β1, β2 et β3 (Hannigan *et al.*, 1996). Comme nous l'avons déjà évoqué, le domaine catalytique d'ILK ne possède pas certaines séquences critiques pour l'activité catalytique (Chan & Tschlis, 2001) et il semble que l'activité kinase de ILK, *in vitro* et *in vivo*, n'est pas requise pour les voies de signalisation induites par les intégrines (Hill *et al.*, 2002). Malgré cela, ILK est requise pour la transduction des signaux médiés par les Intégrines (Zervas *et al.*, 2001). La protéine ILK peut se lier à de nombreuses protéines, dont la plupart sont impliquées dans la régulation du cytosquelette d'actine, via sa partie N-terminale qui contient quatre répétitions de type ankyrine et un domaine PH. Parmi ces protéines on retrouve la paxilline (Turner *et al.*, 1999), les protéines adaptatrices PINCH-1 et -2 (Zhang *et al.*, 2002) et les parvines (qui sont des protéines liant l'actine) (Olski *et al.*, 2001; Legate *et al.*, 2006). Ces adaptateurs peuvent recruter des protéines de régulation de la dynamique de l'actine, telles que les GEFs de Rac et Cdc42, DOCK180 et βPIX, et leurs effecteurs WASP, PAK.

III - La perte de l'adhérence : mort ou survie ?

A - L'apoptose en condition non adhérente : L'anoïkis

L'anoïkis est défini comme un mécanisme d'apoptose induit par la perte de signaux d'adhérence cellulaires corrects (Frisch & Francis, 1994; Meredith *et al.*, 1993). Ce phénomène a été mis en évidence dans de nombreux types cellulaires, tels que les fibroblastes (McGill *et al.*, 1997), les cellules endothéliales (Re *et al.*, 1994), les cellules épithéliales (Boudreau *et al.*, 1995) ou les neurones (Bonfoco *et al.*, 2000). L'anoïkis a longtemps été étudiée *in vitro* en supprimant totalement l'adhérence cellule-matrice, mais on sait aujourd'hui qu'une MEC inappropriée (c'est-à-dire dont la composition ne correspond pas aux intégrines exprimées par la cellule) peut induire l'anoïkis (Gilmore, 2005).

L'anoïkis joue un rôle important dans le développement et le maintien de l'homéostasie de l'organisme (Grossmann, 2002). L'importance de l'anoïkis *in vivo* est clairement établie. Ainsi, la perturbation des mécanisme de contrôle de l'anoïkis entraînent la métastase tumorale, processus qui requiert la survie cellulaire dans des environnements totalement inappropriés (Douma *et al.*, 2004).

Etant donné la diversité des voies de signalisation induites par les Intégrines, plusieurs mécanismes d'induction de l'apoptose lors de l'anoïkis, ont été proposés en fonction du type cellulaire. En plus de la réorganisation du cytosquelette, la mise en suspension des cellules

conduit à une modification de l'organisation et de l'activité des récepteurs à activité tyrosine kinase et des récepteurs de mort (Finbloom & Wahl, 1989; Schleiffenbaum & Fehr, 1990; Arora *et al.*, 1995; Aoudjit & Vuori, 2001), à une augmentation du niveau d'AMPc, à un découplage des voies de signalisation des GTPases (Howe & Juliano, 2000; Schwartz & Shattil, 2000) et à l'altération de la transcription (Vitale *et al.*, 1999). Toutes ces modifications induisant l'apoptose principalement par la voie mitochondriale.

Dans la majorité des cas, l'activation de la voie PI3K/Akt induit une protection vis-à-vis de l'anoïkis (Zugasti *et al.*, 2001). Il a été montré que les GTPases Rac1 et Cdc42 sont impliquées dans la régulation de l'anoïkis. En effet, la surexpression d'un mutant constitutivement actif de Rac1 protège les cellules épithéliales de l'anoïkis, via l'activation des voies MAPK, NFκB et Akt (Coniglio *et al.*, 2001). Alors que la surexpression de mutants dominant négatifs de Rac1 et Cdc42 en mime les effets (Zugasti *et al.*, 2001; Rul *et al.*, 2002).

B - La survie en condition non adhérente : les lymphocytes T mémoires

Le système immunitaire assure la protection de l'organisme grâce à 2 catégories de réponses, la réponse immunitaire innée et la réponse immunitaire adaptative. Une des caractéristiques essentielle de la réponse immunitaire adaptative est la mémoire immunologique. En effet, le système immunitaire est capable de conserver le « souvenir » indélébile de chaque pathogène avec lequel il a été en contact. Ainsi, chaque nouvelle exposition à un pathogène connu induit une réponse immunitaire plus rapide et plus forte que la précédente. Ces « souvenirs » prennent la forme de cellules mémoires spécialisées issues de la prolifération clonale induite par la première exposition au pathogène et qui contrairement aux cellules effectrices qui vont éliminer le pathogène avant d'être éliminées à leur tour, vont survivre à long-terme au sein de l'organisme. C'est cette caractéristique des cellules mémoires qui nous intéresse.

Les cellules mémoires sont des lymphocytes capables de survivre en absence d'adhérence avec la matrice. Les signaux permettant la survie de ces cellules sont donc principalement issus de la fixation de cytokines sur leurs récepteurs. Une des catégories de cellule mémoire a retenu notre attention, les lymphocytes T CD8 mémoires. Les lymphocytes T CD8 interviennent dans la réponse immunitaire adaptative à médiation cellulaire contre les pathogènes intracellulaires. Ces cellules expriment un pattern de molécules membranaires caractéristiques, elles sont CD62L^{low}, CD44^{high}, CD122^{high} (IL-2Rβ). Une des cytokines importantes dans le maintien du pool de cellules mémoires est l'IL-15 (Goldrath *et al.*, 2002; Vella *et al.*, 1998; Pulle *et al.*, 2006), sur laquelle nous reviendrons plus en détail ultérieurement.

Chapitre 1
GTPase et survie cellulaire

Section I : Une nouvelle voie de régulation d'Akt par la GTPase Rac et SHIP dans les cellules non-adhérentes

I - Introduction

Comme cela a été décrit précédemment la kinase Akt joue un rôle essentiel dans la régulation de la survie cellulaire dans de nombreux types cellulaires. L'activation d'Akt nécessite l'activation de la PI3K et la génération de PI(3,4,5)P₃. Dans la plupart des modèles étudiés, cette activation est indépendante de l'activité de la GTPase Rac1. Les travaux antérieurs du laboratoire ont mis en évidence un nouveau mode d'activation de la voie PI3K/Akt dépendant de l'activité de la GTPase Rac1 dans les lymphocytes T (Genot *et al.*, 2000). *Ce travail a mis en évidence l'existence d'une voie d'activation alternative d'Akt dans laquelle la GTPase Rac1 est en amont de la PI3K dans des cellules hématopoïétiques non adhérentes.* Cette section regroupe les résultats obtenus dans le travail de caractérisation de cette nouvelle voie de signalisation.

La première partie regroupe un ensemble de résultats présentés sous forme d'un article scientifique (Article 1). Dans cet article nous apportons des éléments nouveaux concernant les protéines régulatrices en évaluant l'implication de l'isoforme hématopoïétique de Rac, Rac2, des PI-phosphatases PTEN et SHIP et de l'état d'adhérence des cellules dans des modèles hématopoïétiques. Nous avons aussi cherché à préciser les mécanismes moléculaires en recherchant des interactions entre la forme active de Rac1 (V12Rac1) et Akt.

La deuxième partie regroupe des résultats complémentaires à ceux présentés dans l'Article 1, notamment la localisation subcellulaire des protéines d'intérêt (exogènes et endogènes), Rac1 et Akt dans des cellules adhérentes et non adhérentes. Nous essayons également de comprendre le mécanisme d'action de la phosphatase SHIP dans cette voie de signalisation.

Dans une troisième partie, nous décrivons les hypothèses et stratégies pour continuer la caractérisation de cette voie. Nous y décrivons les outils moléculaires que nous avons construits pour étudier le rôle de la PI3K et plus particulièrement celui de la sous-unité régulatrice p85.

II - Article 1

“ Non adherent cells switch to a Rac-mediated, SHIP regulated, Akt activation mode for survival ”

Benjamin CHAIGNE-DELALANDE, Guerric ANIES, IJsbrand KRAMER and Elisabeth GÉNOT

Soumis à Oncogene

Non adherent cells switch to a Rac-mediated, SHIP regulated, Akt activation mode for survival

Benjamin Chaigne-Delalande, Gueric Anies, IJsbrand Kramer and Elisabeth Génot

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

* 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

A - Abstract

We previously showed that Rac stimulated Akt in T lymphocytes cultured in suspension. a regulation which contrasts with findings obtained in other cell types grown on substrate. Using various cell lines and transient transfection protocols, we now show that the regulation of Akt by Rac is not restricted to the hematopoietic lineage, is not dependent on the expression of PTEN nor on the Rac isoform. 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.

Key words: GTPases/Akt/SHIP/anoikis/signal transduction

B - 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 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 & Ruoslahti, 1997; Watton & Downward, 1999). Consequently, disruption of the interaction between cells and/or extracellular matrix induces apoptosis (anoikis) (Ruoslahti & 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 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 PH 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 &

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). 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.*, 2004). Although activation of Akt is mainly dependent on phosphoinositide levels, some molecules can alter Akt activity by direct binding to the kinase (Du & 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.

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 & 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 (Higuchi *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.

C - 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 J.HM1 T-cell clone and Akt activity was measured in an *in vitro* kinase assay using H2B (Histone 2B) as substrate. Data presented in *Figure 20A* 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 (*Figure 20B*). Since Rac1 is the ubiquitously expressed isoform of Rac, further investigation of the regulation of the Rac → Akt pathway was carried out with Rac1.

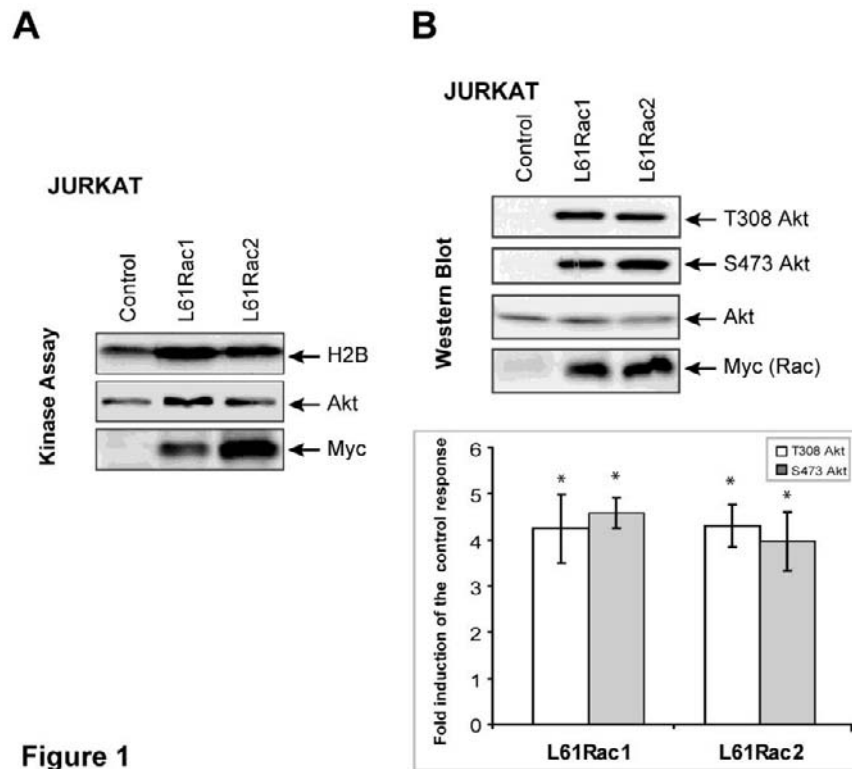


Figure 20 : Both Rac1 and Rac2 can regulate Akt activity. (A) Jurkat cells were co-transfected with plasmids encoding HA-Akt together with either empty vector (control), myc-L61Rac1 or myc-L61Rac2. Cells were allowed to recover from the transfection procedure and to express the constructs overnight. Cells were then harvested and subjected to kinase assay using H2B as a substrate. (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.

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 J.HM1 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 (Figure 21A). 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 (*Figure 21A*). Re-introduction of PTEN reduced phosphorylation on both T308 and S473 (*Figure 21B*) 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 (*Figure 21C*). 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.

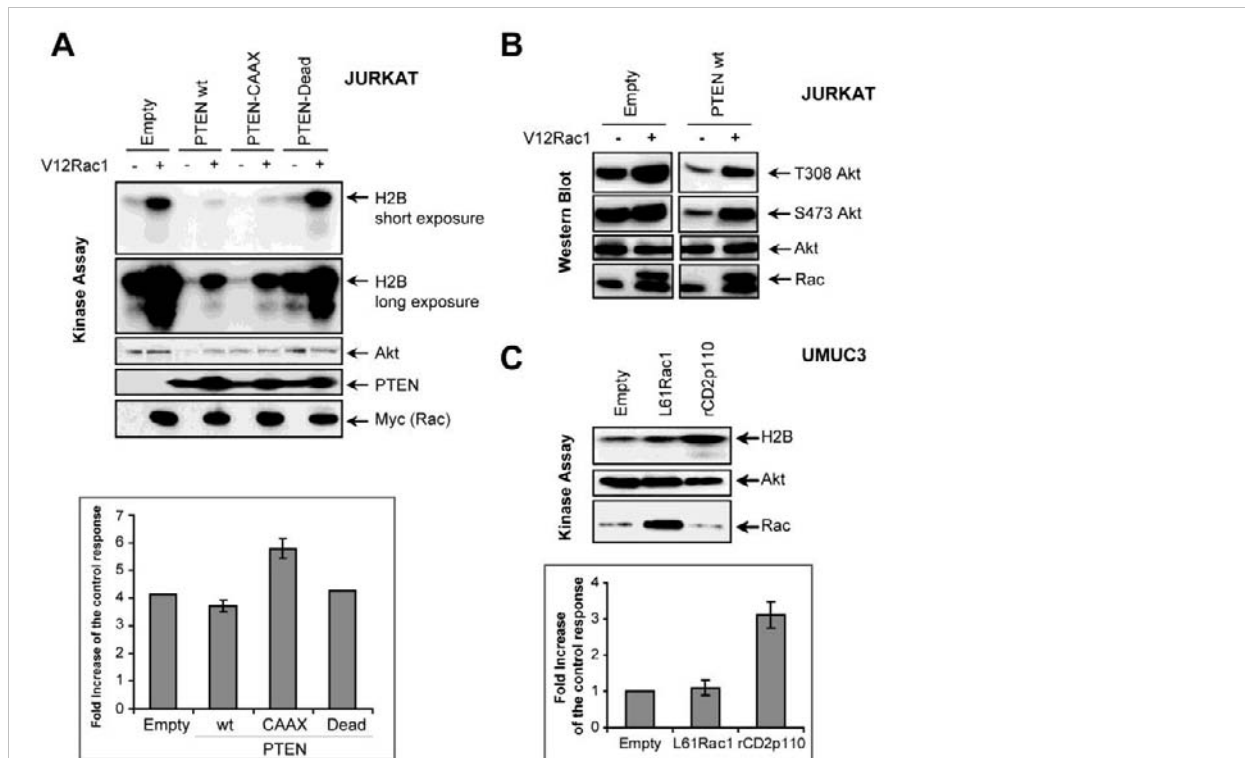
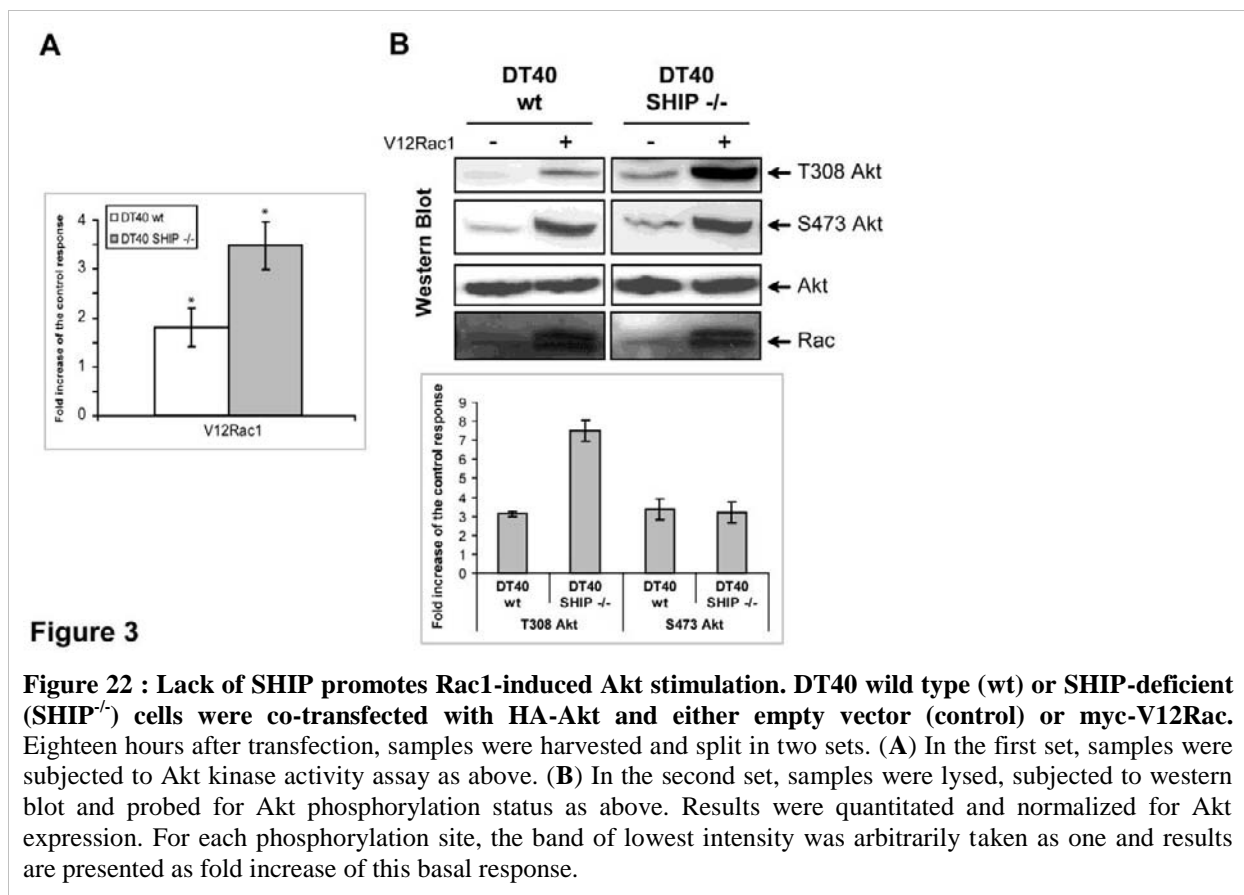


Figure 2

Figure 21 : 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 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 rCD2p110 encoding plasmids and assayed as in A. Results were quantitated and are presented as in A.

3 - SHIP is involved in Rac-induced Akt activation

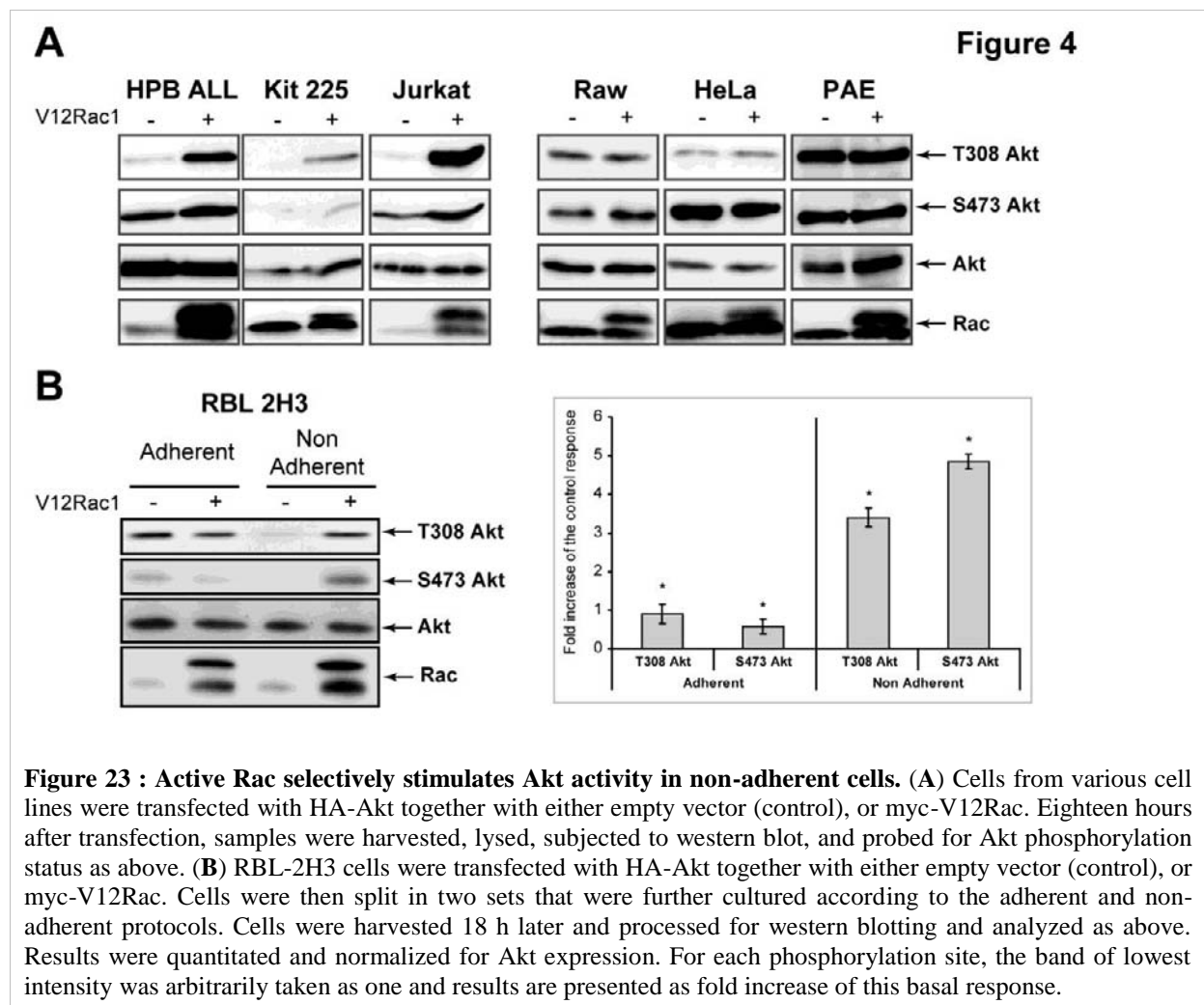
The ubiquitously expressed lipid phosphatase SHIP2 and its lymphocyte-restricted SHIP1 (or SHIP) homologue mediate important feedback mechanisms on Akt regulation (Krystal, 2000). We therefore designed experiments to explore the impact of the absence of SHIP on Rac1-induced Akt activity. To this end, we used an established SHIP-deficient cell line (Ono *et al.*, 1997), DT40 SHIP^{-/-}, 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 (Figure 22A). When comparing DT40 SHIP^{-/-} 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 (Figure 22A). 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 (Figure 22B).



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

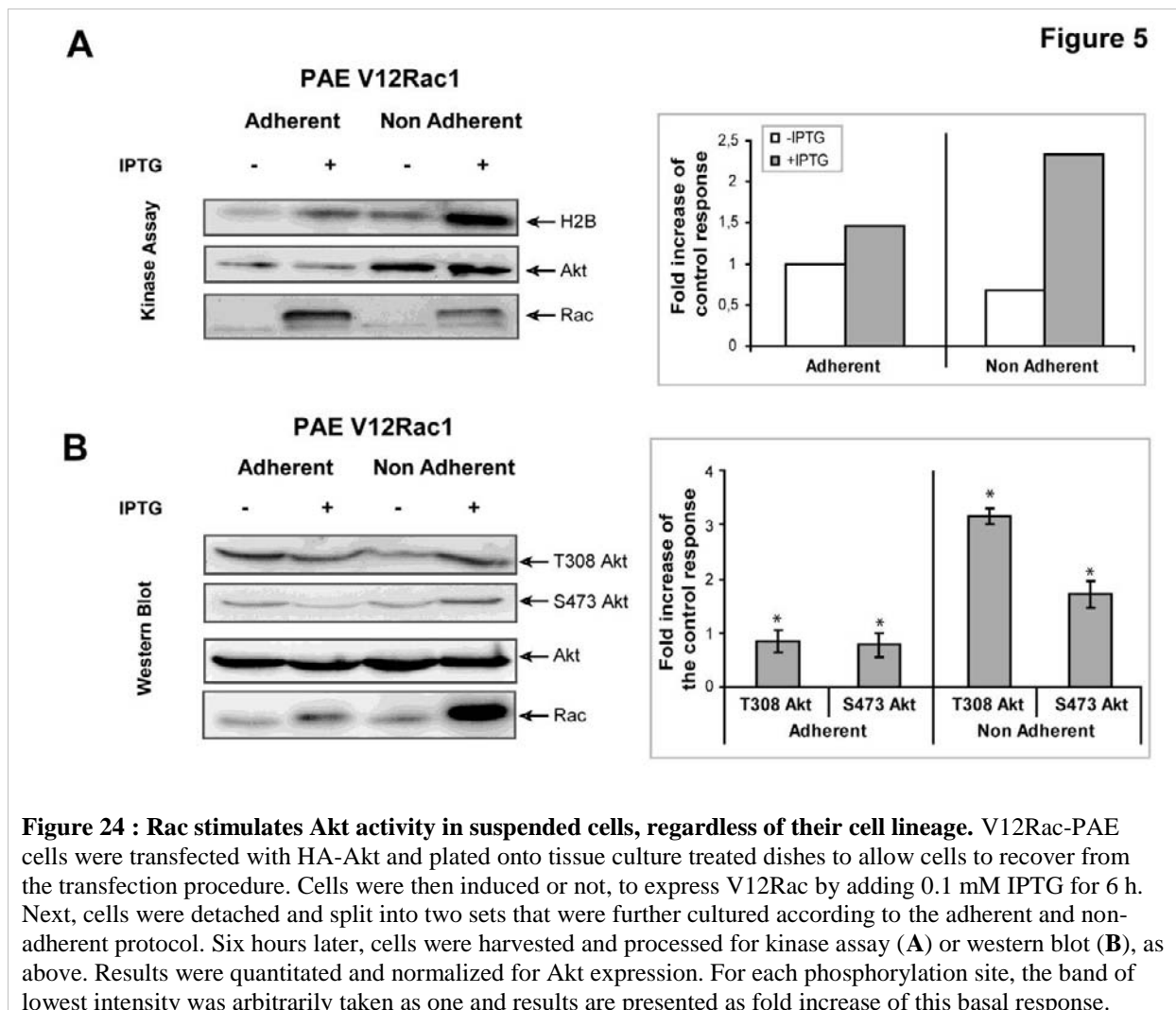
After co-transfection of different cell lines with plasmids encoding HA-Akt and V12Rac1, we observed an increase in Akt phosphorylation in some hematopoietic cells lines

such as HPB-ALL (acute leukemia T cells), Kit225 (T lymphocytes) (*Figure 23A*), U937 (pro-myelocytic) or BL41 (Burkitt lymphoma) (data not shown) but not in other cells such as Raw (macrophage-derived), HeLa (epithelial origin) and PAE cells (endothelial origin) (*Figure 23A*). HeLa, PAE and Raw cells differ from the others by their property to adhere to plastic culture dishes. These results suggested that the Rac \rightarrow 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, RBL-2H3, which can be cultured under either condition (Grodzki *et al.*, 2003). RBL-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 *Figure 23B* 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 RBL-2H3 cells display all the components of the Rac \rightarrow 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 (Figure 24A), which correlated with enhanced phosphorylation on T308 and S473 (Figure 24B).



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^{-/-} cells. In adherent cells, the deficit in SHIP produced a dramatic increase in Akt basal phosphorylation on both sites (*Figure 25A*). 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 *Figure 25B* 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 (*Figure 25C*).

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).

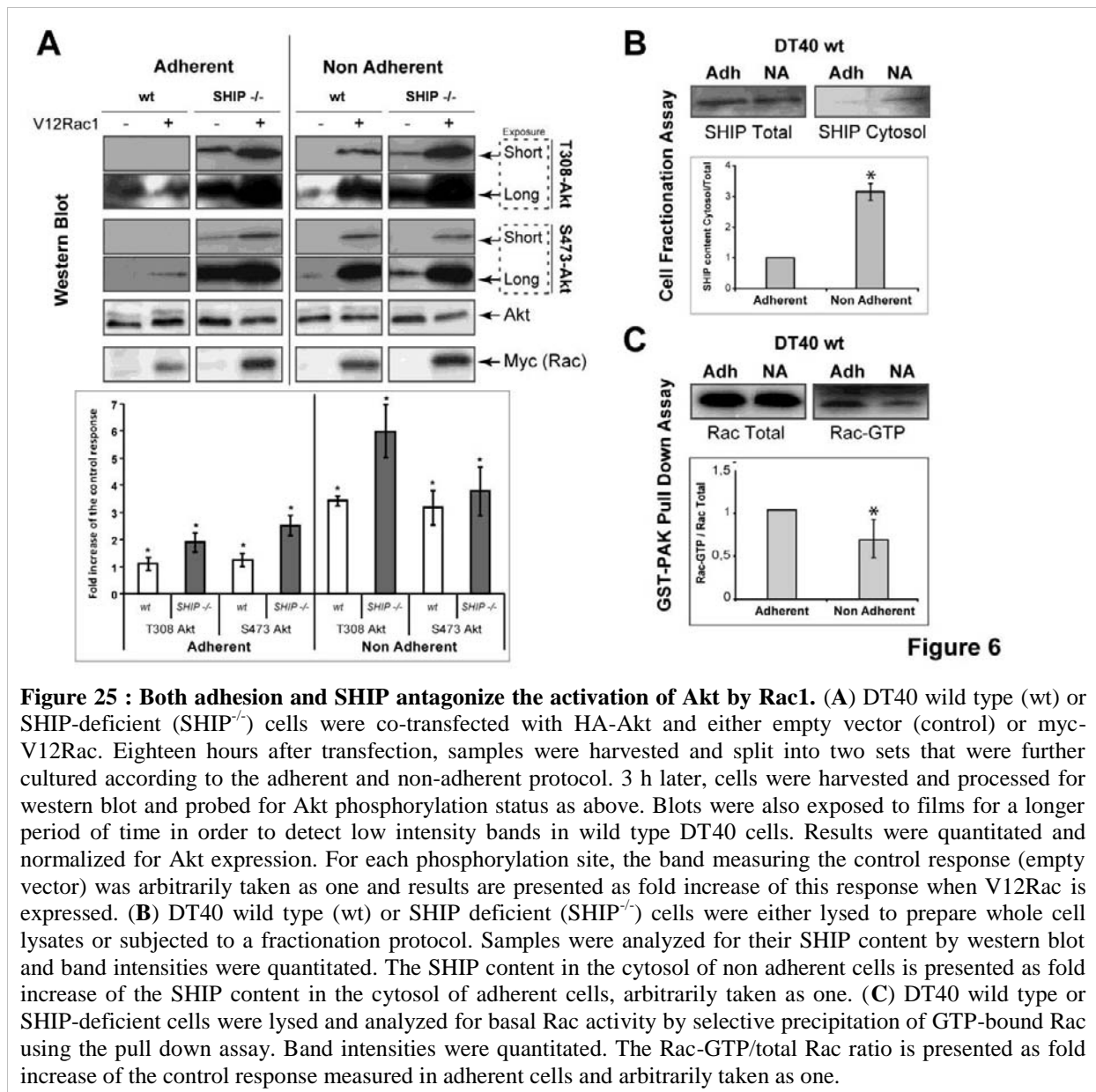


Figure 6

Figure 25 : Both adhesion and SHIP antagonize the activation of Akt by Rac1. (A) DT40 wild type (wt) or SHIP-deficient (SHIP^{-/-}) 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 (SHIP^{-/-}) 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 or SHIP-deficient 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.

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 HA-Akt together with myc-V12Rac, and Akt or Rac1 were immunoprecipitated using anti-tag antibodies (anti-HA or anti-myc, respectively). Results presented in *Figure 26A* show that immunoprecipitating HA-Akt pulls down myc-V12Rac1.

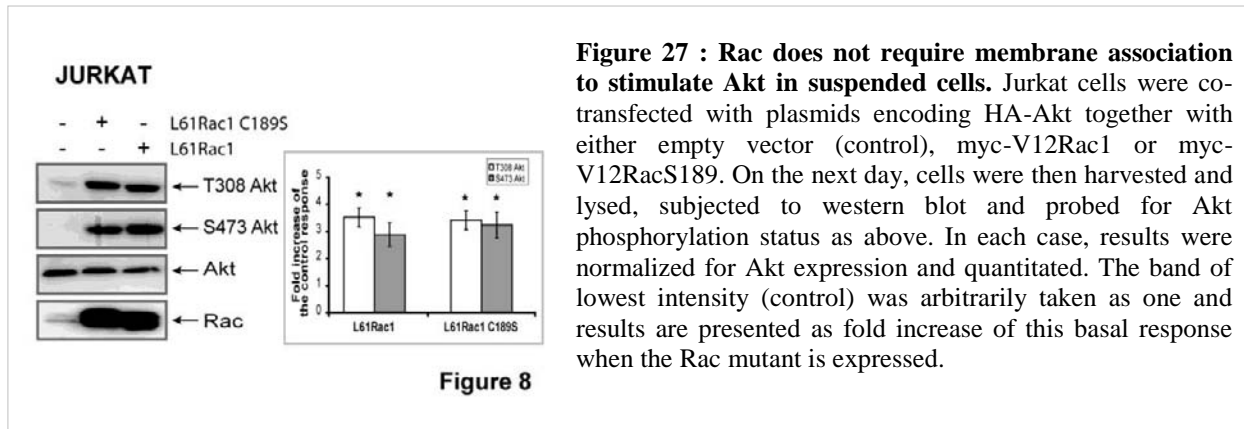
To explore the role of SHIP in the association of active Rac1 with Akt, a similar experiment was performed with SHIP-deficient cells. The representative experiment presented in *Figure 26B* shows that the amount of Rac1 co-immunoprecipitated with Akt was increased in these cells (2.5-fold). The converse 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 (*Figure 26B*). 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 *Figure 26C* 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 *Figure 26D* 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 & Nelson, 2001). 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 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 (Figure 27). 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.



D - Discussion

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 (Singh *et al.*, 2004). Expression of a constitutively active Rac1 in PAE cells bypasses the 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.*, 2001b).

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 (Marte *et al.*, 1997) and the basal Akt activity required for maintenance of cell survival. When grown in tissue-culture dishes, 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 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.

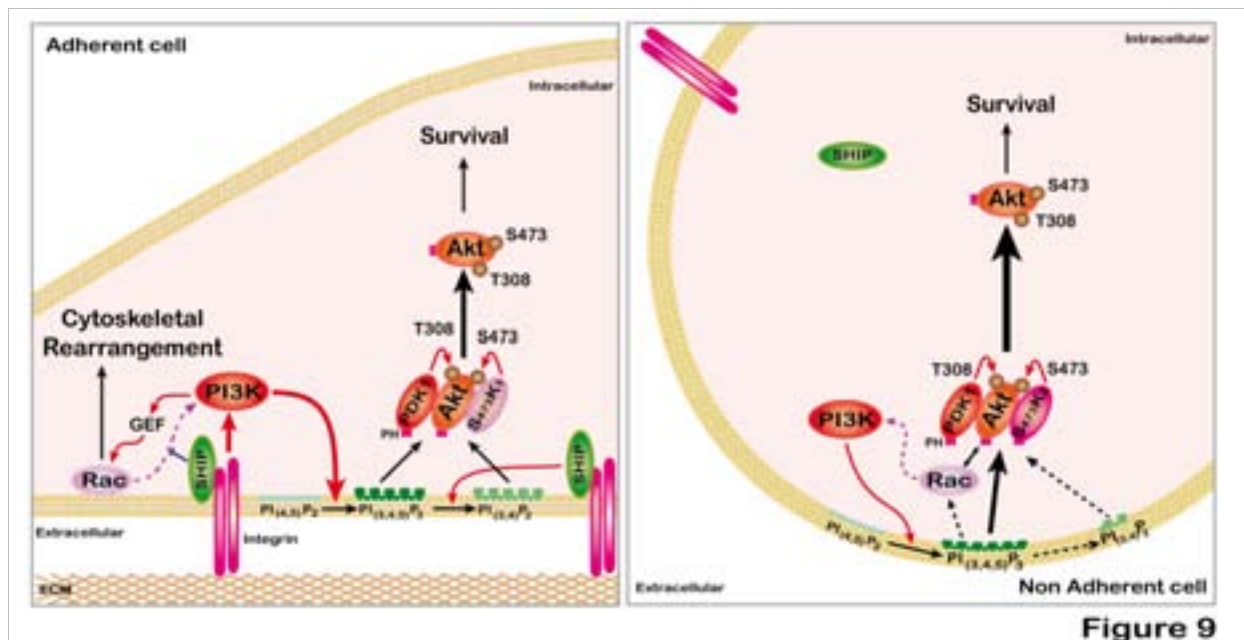


Figure 28 : Model of Rac-stimulated Akt activation in non-adherent cells. Details of the model are discussed in the text. Our results point to a role for SHIP in the switch of the Rac → Akt pathway in non-adherent cells.

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 p130^{CAS}, which provides binding sites for the SH2 domains of SHIP (Nojima *et al.*, 1995; Prasad *et al.*, 2001). p130^{CAS} 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 p130^{CAS} 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.*, 2001a) might subsequently relay integrin signals in Akt activation and maintain cell survival in loosely adherent cells. 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 PH domain deletion mutant established that this domain is essential for the molecular association of the Rac1-Akt complex. Interestingly, Rac1 has been shown to bind and thereby activate PLCβ2 through binding to its PH domain (Snyder *et al.*, 2003). Furthermore, the Akt PH domain is instrumental in Tc11-mediated, PI3K-dependent Akt activation, where phosphorylation and activation occur through oligomerization of Tc11 (Laine *et al.*, 2000). Interestingly, Rac can also oligodimerize under certain conditions (Zhang *et al.*, 2001). 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.*, 1998). Members of this class contain distinct regulatory (p85) and catalytic (p110) subunits. In many cells, Ras can regulate Akt through its interaction with 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; Tolia *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 & 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. 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^{-/-} 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.

E - 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% CO₂. The avian lymphoma cell lines DT40 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, 10⁷ 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.*, 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 μ F) except UMUC3, 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 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. 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- Δ 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 Akt 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 and subjected to kinase assay using H2B as a substrate, and analysed by SDS-PAGE, as described (Genot *et al.*, 2000). The lower half of the gel was dried down and 32 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% BSA, then incubated with the appropriate primary antibodies, followed by the corresponding horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies. Bands were detected using a chemoluminescence kit (Amersham). 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 Na_3VO_4 , 0.5 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 5 mg/ml leupeptin and pepstatin. Lysates were clarified by centrifugation before incubation of the supernatant with antibody (as indicated in the figure legends) in a total volume of 0.5 ml 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 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 (Sander *et al.*, 1999; Moreau *et al.*, 2003). 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 (1×10^7) 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_2 , 1 mM DTT, 2 mM Na_3VO_4 , 0.5 mM 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 24 h 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[®] XL Coulter cytometer equipped with a EXPO32[®] software.

Statistics. Quantification values represent the mean of 3 independent experiments +/- SD. Significance was determined using the Student's t test (* $P \leq 0.05$).

F - Acknowledgments

We thank Drs. P. Parker (Cancer research UK, London, UK), P. Hawkins (The Inositide Laboratory, The Babraham Institute, Cambridge, UK), N. Varin (U363 INSERM, Paris, France) for cell lines, Dr. B. Hemmings (Friedrich Miescher Institute for Biomedical Research, Basel, Switzerland) for CTMP antibodies, Dr. G. Gacon (INSERM U567, Paris, France) and A. Hall (UCL, London, UK) for Rac encoding plasmids, Dr. B. Burgering (Dpt of Physiological Chemistry, 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”. BCD is a recipient of a fellowship from the “Délégation Générale pour l'Armement” and GA from the French Ministry of Education, Research and Technology.

III - Données supplémentaires

A - Localisation cellulaire de Rac, activité de Rac et morphologie cellulaire

1 - Etude des mutants de Rac, L61Rac1 et L61Rac1 C189S, localisation cellulaire et phénotype associé

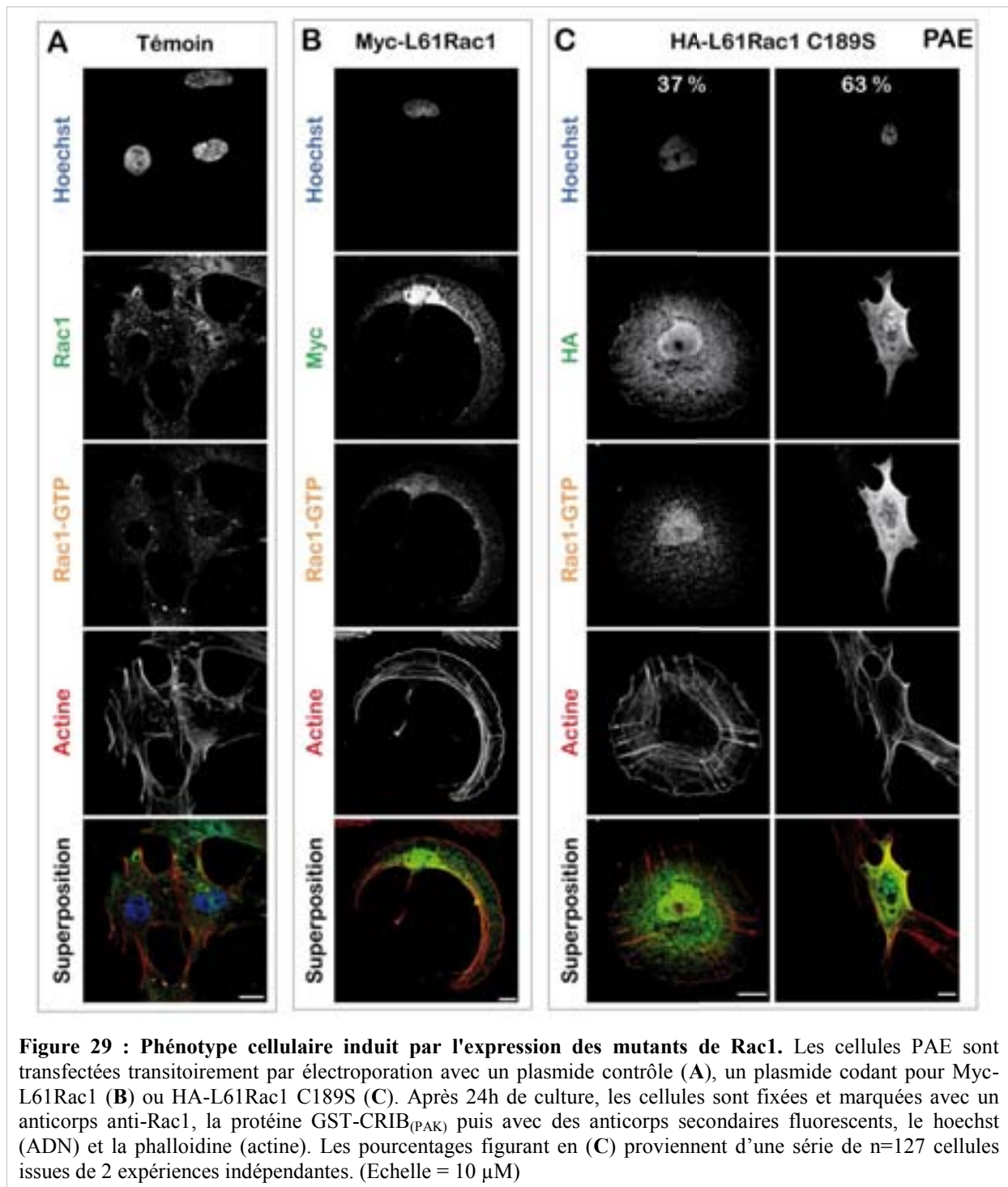
Nous avons vu dans l'introduction et dans la section précédente (*Figure 25* (page 93)) que l'adhérence contrôle la localisation et l'activité des GTPases. De plus, nous nous interrogeons sur la localisation subcellulaire du complexe Rac-Akt mis en évidence dans les expériences de co-immunoprécipitation (*Figure 26* (page 94)). Nous avons utilisé deux mutants de Rac, L61Rac1 et L61Rac1 C189S, rendus constitutivement actifs par la mutation en position 61 pour étudier l'influence de la localisation/relocalisation de Rac lorsque cette voie est sollicitée.

Dans cette partie, nous décrivons les propriétés des deux mutants de Rac, leur localisation subcellulaire et les modifications morphologiques qu'ils entraînent. Pour identifier le ou les compartiment(s) cellulaire(s) dans lesquels sont localisés les mutants de Rac dans la cellule, nous avons détecté les formes Rac-GTP *in situ* par une approche d'immunofluorescence classique avec un anticorps dirigé contre la protéine Rac1 associée à une détection indirecte de Rac1-GTP par l'utilisation de la protéine de fusion GST-CRIB_(PAK) purifiée comme sonde. En effet, cette protéine de fusion contient une séquence CRIB reconnue par Rac1 et Cdc42 sous leurs formes GTP uniquement. La détection de cette protéine est réalisée via un anticorps dirigé contre la GST. La superposition des deux marquages identifie les zones dans lesquelles les molécules Rac1 sont sous la forme Rac1-GTP.

Dans les fibroblastes, la surexpression du mutant constitutivement actif de Rac1, L61Rac1 induit la formation de lamellipodes (Hall *et al.*, 1993). Nous avons recherché les modifications de l'organisation du cytosquelette d'actine induites par la surexpression du mutant L61Rac1 C189S, qui est incapable d'être recruté à la membrane (Meller *et al.*, 2002). Nous avons surexprimé de manière transitoire les plasmides codant pour les mutants Myc-L61Rac1 ou HA-L61Rac1 C189S dans les cellules endothéliales d'aorte de porc (PAE) et réalisé un marquage de Rac1 et Rac1-GTP en immunofluorescence. Les images présentées dans ce paragraphe ont été acquises sur microscope confocal. Les cellules PAE présentent un phénotype relativement étalée, avec quelques fibres de stress et un marquage de Rac1-GTP relativement faible localisé à la périphérie de la cellule (*Figure 29A*). La surexpression du mutant L61Rac1 induit un changement morphologique important, la cellule développe un grand lamellipode et prend la forme d'un croissant. Le marquage de Rac1-GTP est localisé au

niveau de la face interne du croissant, à la périphérie de la cellule, juste sous la membrane (*Figure 29B*). La surexpression du mutant L61Rac1 C189S induit un phénotype très différent du précédent, dans 63% des cas (n=127) la cellule ne présente pas de phénotype particulier (*Figure 29C*), mais dans les 37% restant la cellule s'étale sans développement de lamellipode et les fibres de stress sont augmentées par rapport au témoin (*Figure 29C*). Cette répartition des cellules transfectées ne peut être mise en relation avec le niveau d'expression HA-L61Rac1 C189S qui est comparable dans les 2 cas. On sait que Rac1 joue un rôle crucial dans la transition G1/S du cycle cellulaire (Mettouchi *et al.*, 2001). Une des hypothèses possibles pour expliquer la différence de phénotype observée, peut être que ces 2 populations sont à des étapes différentes du cycle cellulaire, et que le mutant L61Rac1 C189S n'induit un phénotype qu'à une étape particulière du cycle cellulaire. Comme cela a été décrit précédemment (Meller *et al.*, 2002), le marquage de Rac1-GTP nous montre un marquage cytoplasmique, avec cependant un marquage périphérique (*Figure 29C*) pouvant être lié à un recrutement indépendant de la queue géranylgeranyl, tel que l'oligomérisation via la région polybasique située en N-terminale de la séquence CAAX (Zhang *et al.*, 2001).

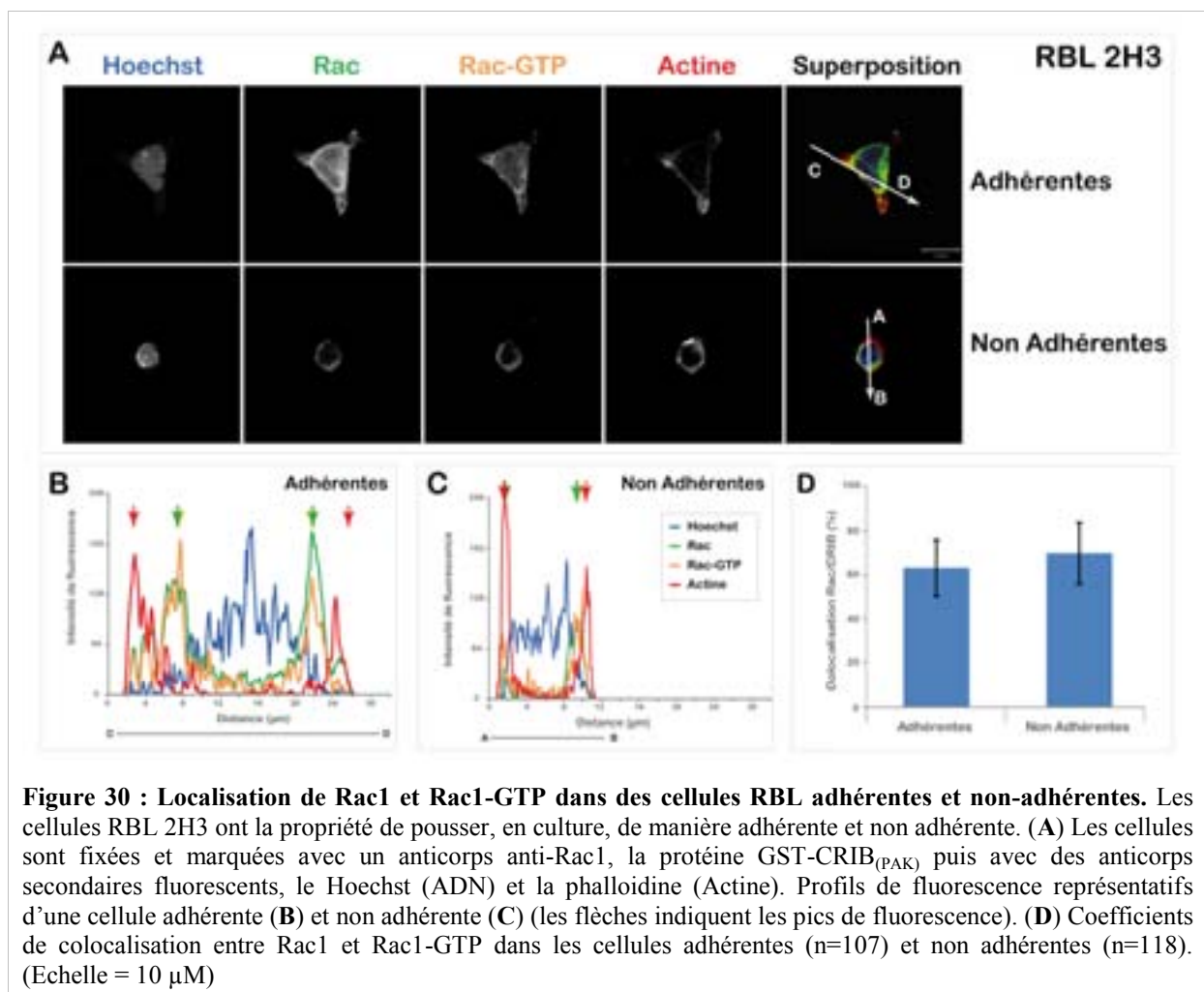
Dans le témoin, le coefficient de colocalisation Rac1/Rac1-GTP est de 74 %, c'est-à-dire que 74 % des pixels positifs pour Rac1 sont aussi positifs pour Rac1-GTP. Le coefficient de colocalisation Rac1-GTP/Rac1 est 99 %, c'est-à-dire que 99 % des pixels positifs pour Rac1-GTP sont aussi positifs pour Rac1. De plus, le calcul des colocalisations de la surexpression des formes activées de Rac1, L61Rac1 et L61Rac1 C189S avec Rac1-GTP donne, respectivement, les valeurs de 96% (Myc/Rac1-GTP) et 88% (HA/Rac1-GTP). Les marquages Myc et HA correspondant à des formes actives de Rac1, il est cohérent d'obtenir une colocalisation forte en les surexprimant. Ces résultats permettent de valider l'utilisation de la sonde GST-CRIB_(PAK) pour le marquage Rac1-GTP.



2 - Comparaison de la distribution de Rac-GTP dans les cellules adhérentes et non adhérentes

Nous avons recherché s'il existait des différences de répartition entre Rac1 et Rac1-GTP endogènes en fonction de l'état d'adhérence des cellules. Pour cela, nous avons utilisé la lignée de mastocytes de rat RBL 2H3, qui en culture montre spontanément deux populations, l'une adhérente et l'autre non adhérente. Cette étude nous a permis de visualiser Rac1 et Rac1-GTP au sein des cellules de même origine et qui ne diffèrent que par leur état

d'adhérence. Dans les cellules adhérentes, le marquage de Rac1 est relativement diffus avec une densité du marquage accentuée à la périphérie de la cellule (*Figure 30A*). Le marquage de Rac1-GTP est clairement périphérique (*Figure 30A* et *Figure 30C*). Le coefficient de colocalisation Rac1/Rac1-GTP est de 63.5 % (± 13.5 %, n=107), c'est-à-dire que 63,5 % des pixels positifs pour Rac1 sont aussi positif pour Rac1-GTP. Comme précédemment le coefficient de colocalisation Rac1-GTP/Rac1 de 95.5 % (± 7.5 %, n=107) permet de valider le marquage Rac1-GTP. Dans les cellules non adhérentes, la géométrie de la cellule est très différente, le cytoplasme est extrêmement réduit, mais on retrouve les marquages Rac1 et Rac1-GTP localisés en périphérie. Dans ces cellules, le coefficient de colocalisation Rac1/Rac1-GTP est de 69.9 % (± 16 %, n= 118). Ainsi, le coefficient de colocalisation entre Rac1 et Rac1-GTP est constant entre l'état adhérent et non adhérent. De plus, si l'on regarde les profils de fluorescence, on remarque que les pics de fluorescence de Rac1 (vert) et Rac1-GTP (orange) sont superposés dans les 2 populations (*Figure 30B* et *Figure 30C*).



Nous pouvons déduire de ces résultats, que par cette technique on ne peut mettre en évidence de différence dans la proportion de Rac1-GTP entre les cellules adhérentes et les

cellules non adhérentes. Cette observation va à l'encontre du modèle actuel d'activation de Rac, selon lequel les sites d'adhérence sont nécessaires à l'activation de Rac1 et que leur absence diminue cette activation (del Pozo *et al.*, 2000). Cependant, si ces résultats s'opposent au dogme et aux données biochimiques obtenues dans les cellules DT40 (*Figure 25C* (page 93)), elles corrélerent avec résultats obtenus en biochimie (par précipitation sélective) dans les cellules A20 (*Figure 35C* (page 113)). La pertinence de cette observation sera détaillée dans un paragraphe ultérieur (page 112). Enfin, l'interprétation de ces résultats doit être relativisée en tenant compte des limites de la technique utilisée. Ces limites seront détaillées dans le prochain paragraphe.

B - La colocalisation de Rac1-GTP et S⁴⁷³Akt est augmentée dans les cellules non adhérentes

Nous nous sommes ensuite intéressés à la localisation de Rac1-GTP et de S⁴⁷³Akt dans les cellules RBL 2H3 adhérentes et non adhérentes. Grâce au marquage précédemment décrit nous avons pu mettre en évidence, dans les cellules non adhérentes une colocalisation accrue de S⁴⁷³Akt et Rac1-GTP par rapport aux cellules adhérentes. Le coefficient de colocalisation S⁴⁷³Akt/Rac1-GTP est de 44,4% ($\pm 8.7\%$, n=121) dans les cellules adhérentes et de 88.4% ($\pm 8.9\%$, n=108) dans les cellules non adhérentes (*Figure 31A* et *Figure 31E*). De plus, nous avons pu observer que la répartition des pics de fluorescence de Rac1-GTP (orange) et S⁴⁷³Akt (vert) est différente en fonction de l'état d'adhérence des cellules. Dans les cellules RBL 2H3 adhérentes, les 2 pics sont proches de la membrane, mais distincts, alors que dans les cellules non adhérentes les 2 pics sont confondus (*Figure 31B* et *Figure 31C*).

Comme on peut le constater sur les *Figures 29A, 30A* et *31D*, les morphologies des cellules adhérentes et non adhérentes sont très différentes. Pour valider, nos résultats nous avons effectué, une étude similaire en comparant RhoA et Rac1-GTP. Au niveau de la colocalisation, RhoA colocalise davantage avec Rac1-GTP dans les cellules adhérentes (54,1% $\pm 5,1$; n=111) que dans les cellules non adhérentes (24,6% $\pm 8,9$; n=111). De plus, l'étude du profil de fluorescence de RhoA (vert) et Rac1-GTP (orange) montre une divergence des pics dans les cellules non adhérentes, ce qui tend à prouver que, malgré les différences morphologiques entre cellules adhérentes et non adhérentes, on peut tout de même détecter des variations de la répartition des protéines dans les cellule non adhérentes.

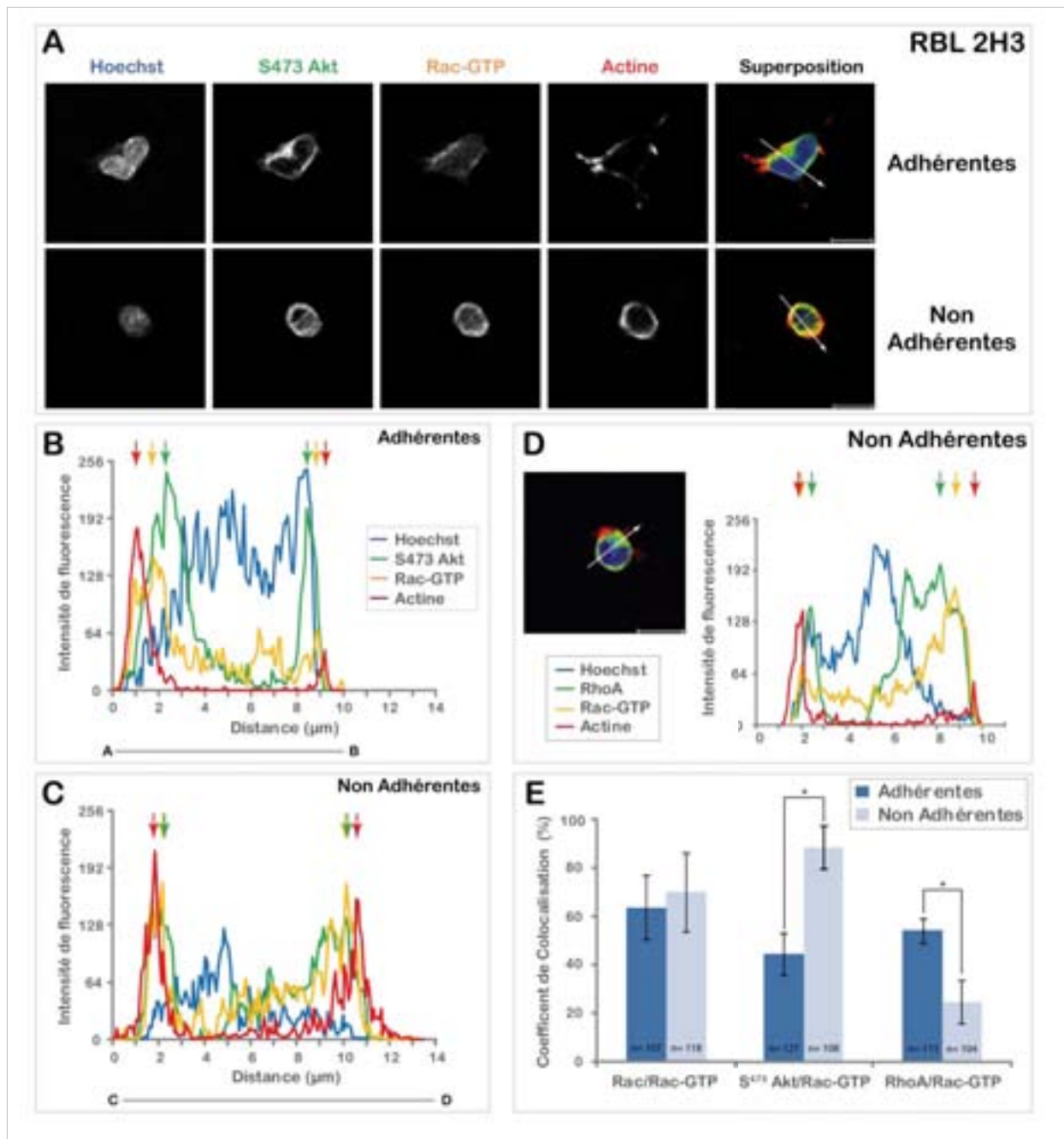


Figure 31 : Localisation de Rac1-GTP et S^{473} Akt dans des RBL adhérentes et non-adhérentes. (A) Les cellules sont fixées et marquées avec un anticorps anti-Rac1, la protéine GST-CRIB_(PAK) puis avec des anticorps secondaires fluorescents, le Hoechst 33342 (ADN) et la phalloïdine-Alexa 635 (Actine). Profils de fluorescence représentatif d'une cellule adhérente (B) et non adhérente (C). (D) Marquage de RhoA et GST-CRIB_(PAK) dans les RBL adhérentes et non adhérentes. (E) Coefficients de colocalisation Rac1/Rac1-GTP, S^{473} Akt/Rac1-GTP et RhoA/Rac1-GTP dans les RBL adhérentes et non adhérentes (synthèse de 2 expériences indépendantes). (Echelle = 10 μm ; * : $p(\text{Adhérentes}/\text{Non Adhérentes}) < 0.05$).

Ces résultats, s'ils sont en accord avec nos observations biochimiques (expériences de co-immunoprécipitations) ne sont que corrélatifs. En effet, les limites des techniques d'imagerie font qu'un pixel d'une image représente, au mieux, 130 nm ce qui à l'échelle moléculaire est considérable et explique le fort bruit de fond. Ainsi, les mesures de colocalisation ne suffisent pas à démontrer l'interaction Rac1-GTP/ S^{473} Akt mais, constituent

cependant un argument dans ce sens. Pour valider cette interaction *in vivo*, il nous faudrait développer un système de FRET entre Rac1 et Akt, ce qui ne peut être envisagé qu'une fois que les régions d'interaction entre Akt et Rac1 auront été déterminées par la biochimie.

1 - Rac1-GTP s'associe avec les formes phosphorylées de Akt dans les cellules non adhérentes

Nos expériences de co-immunoprécipitation ont permis la mise en évidence du complexe V12Rac1-Akt (*Figure 26*). Nous avons aussi testé si cette co-immunoprécipitation était toujours effective lorsque, au lieu de la forme sauvage d'Akt, des formes d'Akt mutées sur les sites de phosphorylations, T308 ou S473 (T³⁰⁸ ou S⁴⁷³ remplacés par une alanine, Akt T308A et Akt S473A) étaient transfectées. Ces mutants montrent un taux de phosphorylation et une activité réduite par rapport à Akt sauvage (Bellacosa *et al.*, 1998; Toker & Newton, 2000). Après expression transitoire des plasmides codant pour ces mutants conjointement à un plasmide codant pour Myc-V12Rac1 dans les cellules Jurkat, nous avons précipité EE-Akt T308A et HA-Akt S473A. Après migration sur gel de polyacrylamide et révélation en western blot, nous n'avons pu détecter aucune des 2 formes phosphorylées (*Figure 32*), alors que la surexpression d'Akt était effective (*Figure 32*). Dans le même temps, nous n'avons pu mettre en évidence de co-immunoprécipitation entre les mutants T308A et S473A et V12Rac1 (*Figure 32*).

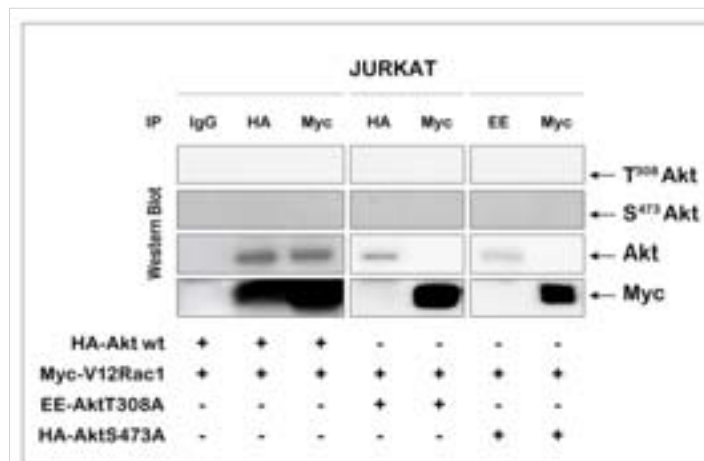


Figure 32 : Seules les formes phosphorylées d'Akt interagissent avec V12-Rac. Les cellules Jurkat sont transfectées transitoirement avec un plasmide codant pour Myc-V12Rac1 conjointement avec un plasmide codant pour HA-Akt, EE-T308A Akt ou HA-S473A Akt. Après 18h de culture, les cellules sont lysées et les lysats sont immunoprécipités avec les anticorps indiqués. Les lysats sont ensuite migrés sur gel de polyacrylamide et révélés en western blot avec les anticorps indiqués.

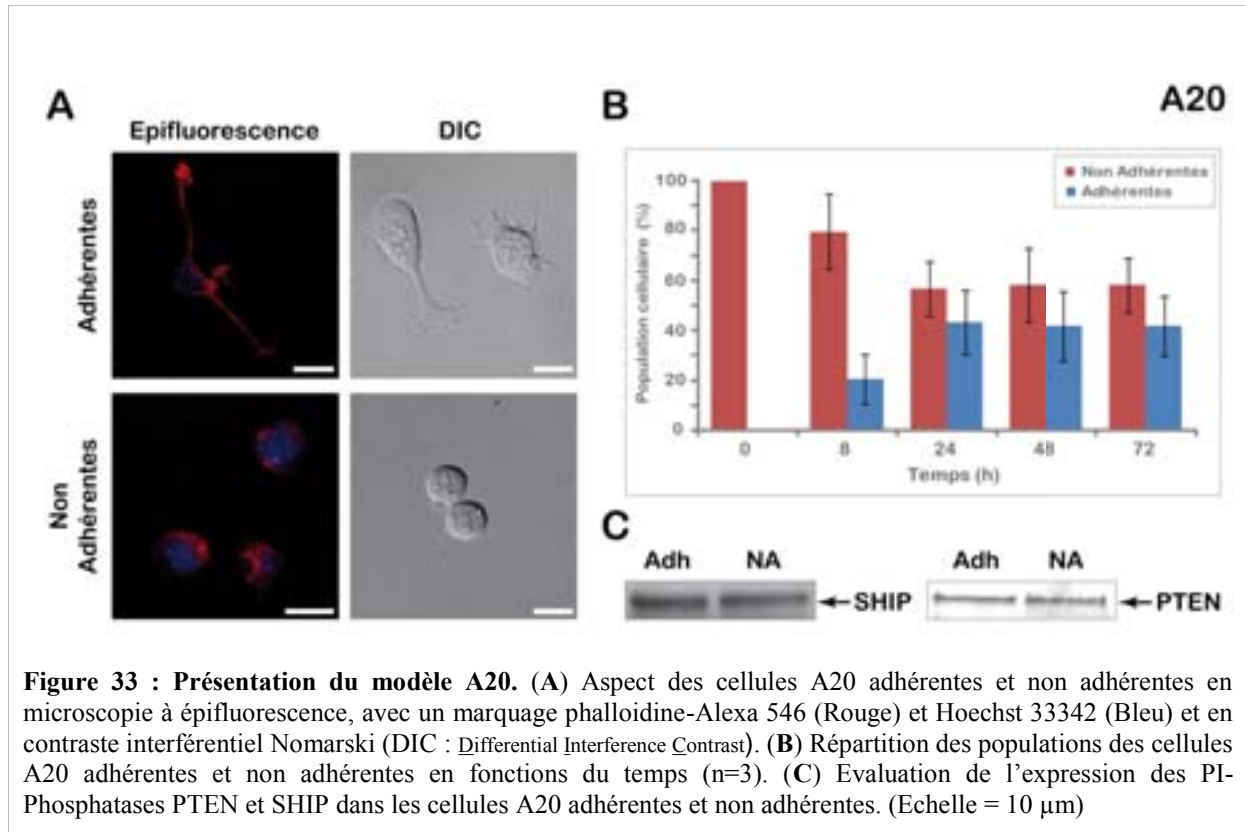
C - Vers une mise évidence de la voie Rac1/Akt endogène

1 - Le modèle cellulaire A20

a - Présentation du modèle

Pour continuer la caractérisation de la voie Rac1/Akt par les techniques de surexpression transitoire, nous avons cherché un modèle cellulaire nous permettant d'étudier des différences entre cellules adhérentes et non adhérentes sur les protéines endogènes. Nous

avons déjà utilisé le modèle de la lignée RBL 2H3 (page 106). Cependant pour des raisons techniques (culture plus facile, transfection plus efficaces...), nous avons préféré nous focaliser sur la lignée de lymphocytes B murin A20.



Cette lignée présente plusieurs caractéristiques intéressantes pour notre étude. Comme la lignée RBL 2H3, cette lignée montre, en culture, une répartition spontanée en 2 populations l'une adhérente et l'autre non adhérente (*Figure 33A*). L'étude de la répartition des populations adhérentes et non adhérentes des cellules A20 au cours du temps, par comptage après coloration au bleu trypan, montre que la composante adhérente augmente au cours des 24 premières heures de culture, avant de se stabiliser aux alentours de 40%-50% de la population totale (*Figure 33B*). De plus, l'étude de l'expression des PI-phosphatases PTEN et SHIP dans les 2 populations en western blot, montre premièrement que les 2 phosphatases sont exprimées dans les cellules A20 et deuxièmement que leur niveau d'expression ne varie pas en fonction de l'état d'adhérence des cellules (*Figure 33C*).

b - Validation du modèle pour l'étude de la voie de signalisation Rac1/Akt

Pour valider ce modèle cellulaire, nous avons tout d'abord exploré l'impact de la surexpression transitoire de V12Rac1 dans les cellules A20 adhérentes et non adhérentes.

Cette surexpression induit une augmentation de la phosphorylation d'Akt sur le résidu T³⁰⁸ uniquement dans la population non adhérente (*Figure 34A*). Dans cette expérience nous avons utilisé un mutant constitutivement actif de la sous-unité catalytique de PI3K p110, rCD2p110, comme contrôle positif. L'expression de ce mutant induit une augmentation de la phosphorylation d'Akt en T³⁰⁸ dans les 2 populations cellulaires (*Figure 34A*).

Nous avons aussi recherché la présence de complexes Rac1/Akt dans les 2 populations de cellules. Les cellules A20 adhérentes et non adhérentes sont transfectées transitoirement avec des plasmides codant pour HA-Akt et Myc-V12Rac1, puis lysées après 24h de culture. Les protéines d'intérêt sont immunoprécipitées avec les anticorps anti-HA, anti-Myc ou un anticorps contrôle (IgG). Ces expériences confirment les résultats obtenus avec les cellules PAE V12Rac1 (*Figure 26C* (page 94)). On observe une co-immunoprécipitation entre Rac1 et Akt uniquement dans les cellules non adhérentes (*Figure 34B*).

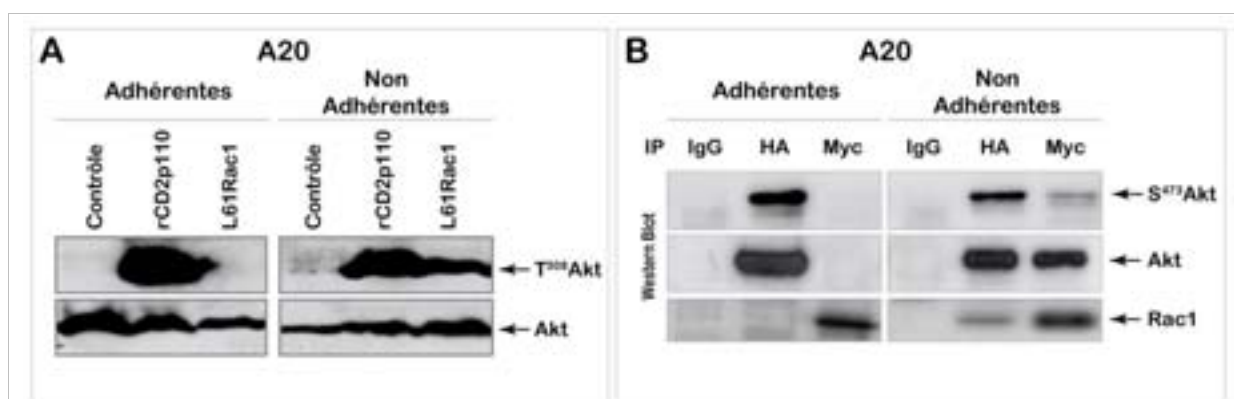


Figure 34 : Validation du modèle A20. (A) Les cellules A20 ont été transfectées avec un plasmide codant pour HA-Akt et un plasmide codant soit pour rCD2p110, soit pour V12Rac1, soit un plasmide vide (Contrôle). Après 24h, les cellules adhérentes et non adhérentes sont lysées séparément, les lysats migrés sur gel de polyacrylamide et révélés en western blot avec les anticorps indiqués. (B) Pour les expériences de co-immunoprécipitations, les lysats ont été mis en contact avec les anticorps anti-HA, anti-Myc ou un anticorps contrôle (IgG), puis migrés sur gel de polyacrylamide et révélés en western blot.

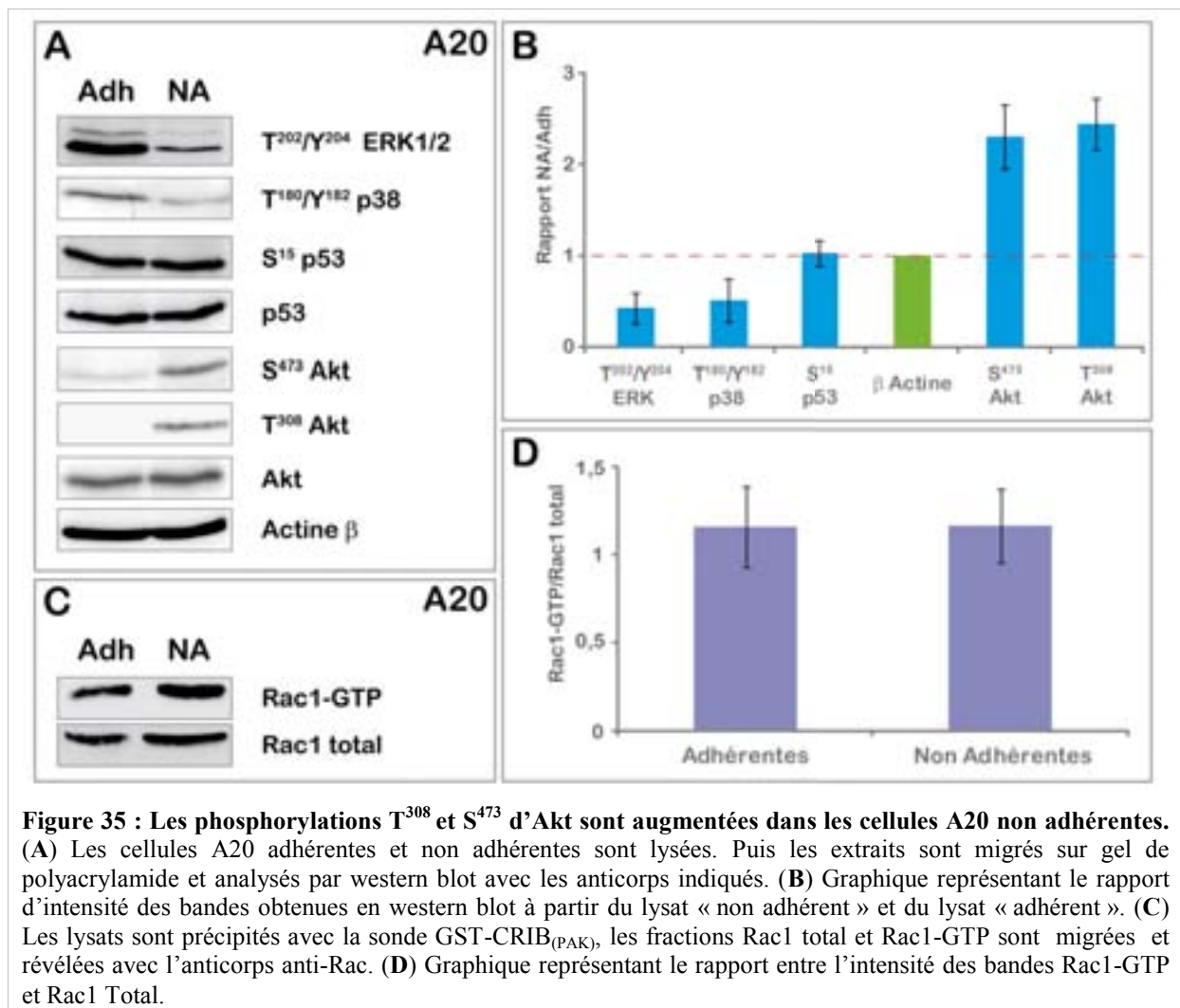
c - Vers une caractérisation de la voie Rac1/Akt endogène

- Statut d'Akt et Rac dans les cellules A20 adhérentes et non adhérentes

Pour observer les différences entre cellules adhérentes et non adhérentes, nous avons analysé et comparé l'état de phosphorylation de plusieurs autres protéines, ERK 1/2, p38, p53, avec les variations observées pour Akt dans les cellules A20. Pour cela, les cellules A20 adhérentes et non adhérentes sont lysées et les deux lysats sont migrés séparément sur gel de polyacrylamide, puis les protéines sont révélées en western blot avec les anticorps spécifiques des formes phosphorylées de ERK 1/2 (T²⁰²/Y²⁰⁴ ERK 1/2), p38 (T¹⁸⁰/Y¹⁸² p38), p53 (S¹⁵ p53)

et Akt (T^{308} Akt et S^{473} Akt). La protéine choisie comme référence est la β -actine (Figure 35A et Figure 35B). Ces expériences mettent en évidence que le niveau de phosphorylation des MAPKs, ERK 1/2 et p38 est diminué de près de moitié (rapport NA/Adh $0,57 \pm 0,2$ ($n=4$) pour ERK 1/2 et $0,49 \pm 0,17$ ($n=4$)) dans les cellules non adhérentes, alors que le niveau de phosphorylation d'Akt est augmenté en T^{308} ($2,45 \pm 0,28$ ($n=4$)) et S^{473} ($2,31 \pm 0,3$ ($n=4$)) (Figure 35A et Figure 35B). Le niveau de phosphorylation et la quantité totale de p53 ne présentent pas de différences significatives entre les cellules adhérentes et non adhérentes (Figure 35A et Figure 35B).

Nous avons recherché le niveau d'expression et l'état d'activation de Rac1 dans les cellules adhérentes et non adhérentes. Dans ce but nous avons réalisé une série de pull down avec la sonde GST-CRIB_(PAK). Le résultat de ces expériences ne montre pas de différence significative du niveau d'expression et de la proportion de Rac1-GTP entre cellules adhérentes et non adhérentes (Figure 35C et Figure 35D).



- La localisation de SHIP diffère entre l'état adhérent et non adhérent

La PI-Phosphatase SHIP est principalement régulée par localisation cellulaire (Phee *et al.*, 2000). Dans les cellules adhérentes, SHIP2 interagit avec l'adaptateur p130^{CAS} (Prasad *et al.*, 2001; Prasad & Decker, 2005). Dans le but de mieux comprendre le rôle et le mécanisme d'action de SHIP dans la voie d'activation d'Akt par Rac1, nous nous sommes intéressés à la localisation cellulaire de SHIP et de p130^{CAS} entre cellules adhérentes et non adhérentes. Nous avons cherché à déterminer si la localisation de SHIP était modifiée par l'état d'adhérence des cellules et si SHIP pouvait interagir avec l'adaptateur p130^{CAS}. Les expériences présentées ci-dessous en sont encore au stade préliminaire.

Pour cela, nous avons dans un premier temps, réalisé des expériences de fractionnement cellulaire sur les 2 populations de cellules. Brièvement, les cellules ont été lysées dans un tampon hypotonique (Cf. matériel et méthodes), homogénéisées au broyeur manuel («*dounce*»), et centrifugées à 100000 g afin de séparer les fractions membranaires (culot) et cytosoliques (surnageant). Les différentes fractions ont été migrées sur gel de polyacrylamide et les protéines d'intérêt révélées en western blot avec des anticorps anti-SHIP, anti-Y⁴¹⁰ p130^{CAS} ou anti-p130^{CAS}. La fraction cytosolique étant beaucoup plus diluée que la fraction membranaire, les charges sont équilibrées par rapport à celle-ci (*Figure 36A*). En présence de sérum, SHIP et P130^{CAS} sont localisées majoritairement dans la fraction membranaire et on n'observe pas de différences entre cellules adhérentes et non adhérentes (*Figure 36A*). Dans un second temps nous avons voulu mettre en évidence une interaction entre SHIP et p130^{CAS}. Pour cela, nous avons réalisé des expériences de co-immunoprécipitation sur des lysats de cellules A20 adhérentes et non adhérentes déprivées en sérum pendant 2h. Ces expériences en sont encore au stade préliminaire. Du point de vue technique on peut remarquer que si l'anticorps anti-SHIP immunoprécipite très bien la protéine SHIP, l'anticorps anti-p130^{CAS} est beaucoup moins efficace (*Figure 36B*). Malgré cette difficulté, nous avons pu mettre en évidence une co-immunoprécipitation entre p130^{CAS} et SHIP dans les cellules adhérentes avec l'anticorps anti-SHIP, mais pas avec l'anticorps anti-p130^{CAS} (*Figure 36B*). Ce résultat reste à confirmer après avoir défini de meilleures conditions d'immunoprécipitation avec l'anticorps anti-p130^{CAS}.

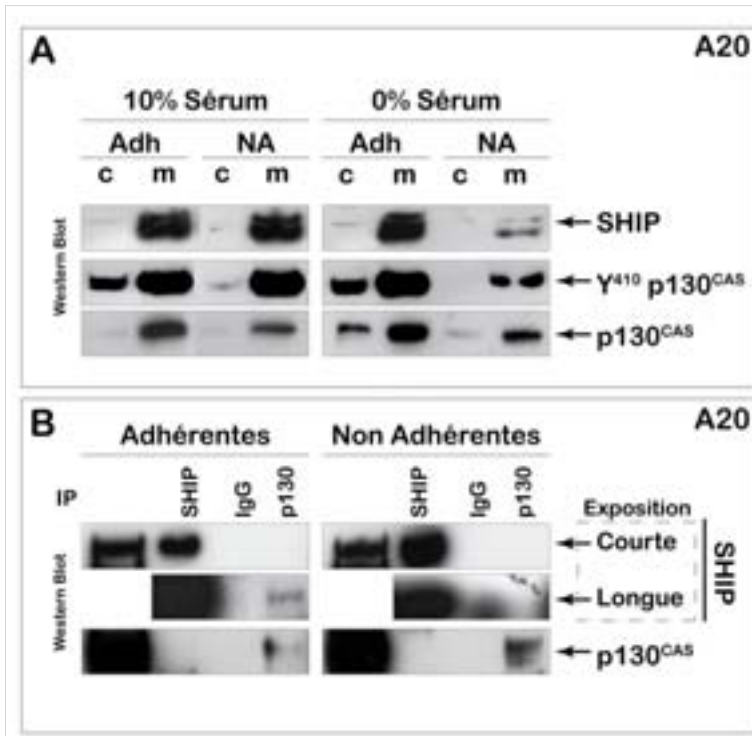


Figure 36 : SHIP interagit avec p130^{CAS} dans les cellules adhérentes. (A) Les cellules A20 adhérentes et non adhérentes déprivées ou non en sérum, ont été lysées avec un tampon hypotonique. Les fractions cytosoliques et membranaires ont été séparées par centrifugation (100 000 g), puis migrées sur gel de polyacrylamide et révélées en western blot avec les anticorps indiqués. Les charges des différentes fractions sont équivalentes. (B) Les cellules A20 adhérentes et non adhérentes sont déprivées en sérum pendant 2h avant d'être lysées. Les protéines d'intérêt sont immunoprécipitées avec les anticorps indiqués à partir des lysats, migrées sur gel de polyacrylamide et révélées avec les anticorps indiqués (une expérience représentative, sur un total de 2 expériences indépendantes).

Comme nous l'avons décrit dans l'introduction de ce manuscrit, la protection contre l'apoptose fait intervenir principalement 2 types de signaux, les signaux issus de l'adhérence et les signaux issus des facteurs de croissance. Dans les expériences précédentes, réalisées par surexpression transitoire, l'aspect facteur de croissance était négligeable ou court-circuitée par l'expression de V12Rac, mais dans les approches visant à identifier les mécanismes endogènes, ces signaux ne peuvent être négligés. Les expériences de fractionnement et de précipitation sélective de Rac1 dans les cellules DT40 ont été réalisées en absence de sérum (pour des raisons techniques, faire adhérer les cellules), mais dans le modèle A20 les cellules adhèrent par elles mêmes, nous devons donc nous affranchir des signaux issus du sérum pour évaluer les différences inhérentes à l'adhérence. Ainsi, dans les cellules déprivées en sérum pendant 2h, on observe une diminution de la fraction membranaire de SHIP et p130^{CAS} dans les cellules non adhérentes (Figure 36A). Cette diminution semble concerner la quantité de protéines totales de SHIP et p130^{CAS}, et semble contredire les résultats obtenus en présence de sérum sur l'expression de SHIP (Figure 33C (page 111)). A la lumière de ces résultats, il serait intéressant de réévaluer l'expression de SHIP et l'activité de Rac1 en fonction de l'adhérence après déprivation en sérum.

D - Développement d'outils moléculaires pour l'étude de la voie Rac1/Akt

Dans la perspective de pouvoir intervenir sur cette voie de survie à des fins thérapeutiques, nous avons focalisé notre recherche sur les mécanismes de couplage entre Rac

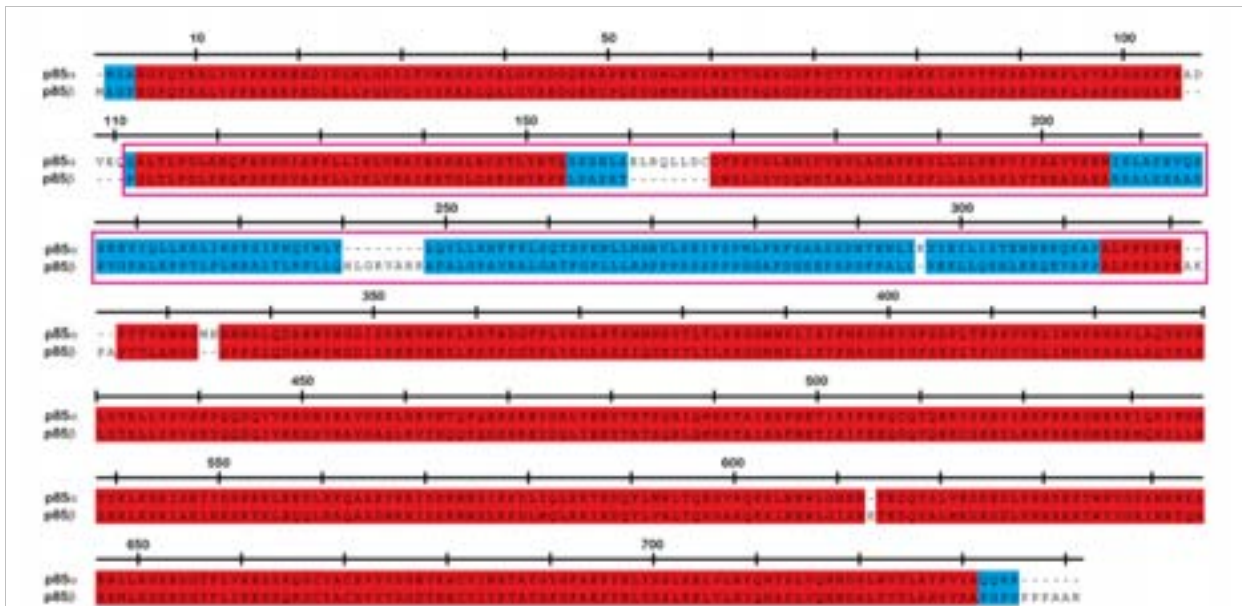


Figure 38 : Alignement des séquences de p85 α et p85 β . Alignement des séquences de p85 α (P129387) et p85 β (O00459) réalisé avec le logiciel T-Coffee (Notredame *et al.*, 2000). Les séquences à fort taux d'homologies sont en rouge et les séquences de faibles homologies en bleu. Le domaine BH est encadré en rose.

Nous avons constitué une batterie de mutants des sous-unités p85 α et p85 β incluant les mutants de délétion du domaine BH (p85 Δ BH) et les mutants BH isolés (*Figure 39A*). Dans un deuxième temps, ces mutants ont été générés sous 2 formes, une forme fusionnée avec la GST (Glutathione S-Transférase) pour les études de précipitations sélectives et la purification des protéines et une forme fusionnée avec la GFP (Green Fluorescent Protein) pour les études de localisation cellulaire. Dans un troisième temps, suite à des problèmes liés à la taille et la nature des étiquettes GST et GFP, nous avons généré ces mutants sous une 3^{ème} forme étiquetée HA (Hémagglutinine) pour les études biochimiques.

Au départ nous disposions de plasmides codant pour les formes entières de p85 α (J. Carpenter, USA) et p85 β (J. Janssen, Allemagne) ainsi que d'un mutant p85 α Δ BH. Nous avons produit le mutant p85 β Δ BH et les domaines BH isolés. Brièvement, la génération du mutant de délétion, p85 β Δ BH, a été réalisée à partir du plasmide pT7T9319 p85 β (J. Janssen). La séquence délétée correspond aux résidus 122-256 de p85 β . La stratégie de délétion repose sur la génération d'un fragment contenant la délétion par PCR (Polymerase Chain Reaction) successives, puis clonage de ce fragment délété entre 2 sites de restriction de part et d'autre du domaine BH. La génération des mutants domaines BH isolés a été effectuée par PCR. Le domaine BH α contient les résidus 110-302 de p85 α et le BH β les résidus 106-289 de p85 β .

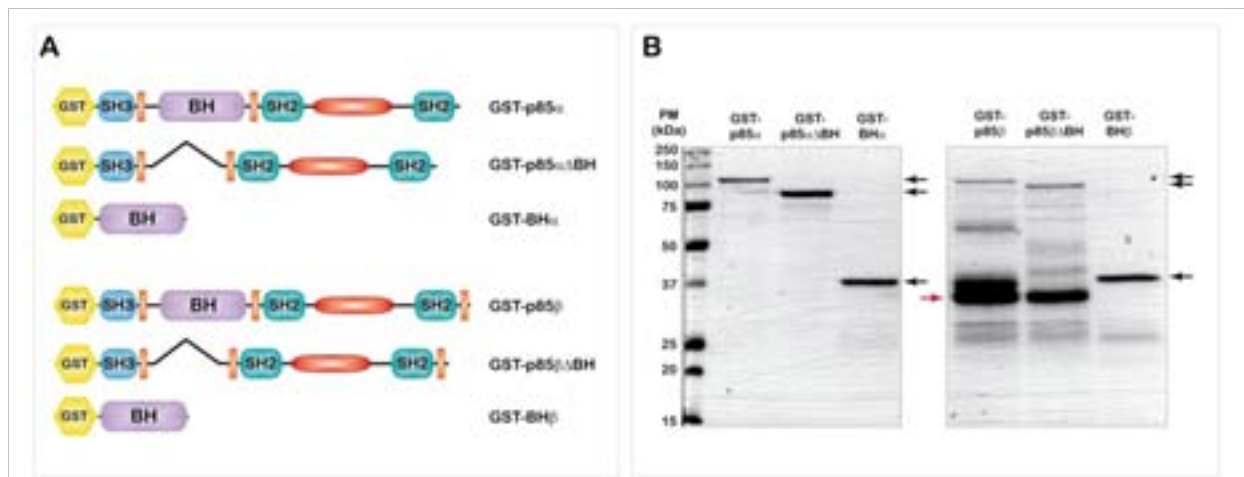


Figure 39 : les mutants des sous unités p85 α et p85 β . (A) Représentation schématique des différents mutants de p85 fusionnés à la GST (Gluthatione S-Transférase) développés au laboratoire. Ces mutants ont aussi été générés sous la forme d'une protéine de fusion avec la GFP (Green Fluorescent Protein) et sous une forme portant l'étiquette HA (Hémagglutinine). (B) Les protéines de fusion GST-p85 α , GST-p85 α ΔBH, GST-BH α , GST-p85 β , GST-p85 β ΔBH, GST-BH β sont purifiées sur billes glutathione-agarose puis migrées sur gel de polyacrylamide et révélées par western-blot avec un anticorps anti-GST. (Les flèches noires indiquent les bandes d'intérêt). La flèche rouge montre un contaminant de poids moléculaire compatible avec la GST (\approx 35kDa).

Dans un souci d'homogénéisation des différentes constructions, dans une seconde étape, nous avons sous-cloné tous les mutants dans différents plasmides afin de produire différentes formes en fusion avec des étiquettes. Cette étape a été effectuée à partir d'une PCR amplifiant la totalité de la séquence des mutants avec des amorces contenant les sites de restrictions BamHI en 5' et EcoRI en 3'. Après digestion par ces 2 enzymes, ces fragments ont été clonés dans les plasmides pGEX2T (pour les fusions GST), pEGFP-C1 (pour les fusions GFP). Concernant l'étiquette HA, nous avons choisi de partir d'un plasmide pRK5-Myc, d'éliminer l'étiquette Myc par digestion enzymatique et de la remplacer par l'étiquette HA. Une fois cette série de sous-clonage effectuée, tous les mutants ont été validés par séquençage.

La *Figure 39B* montre la migration sur gel de polyacrylamide des différentes protéines de fusion GST, purifiées sur billes de Gluthatione-Agarose et révélées avec un anticorps anti-GST. On remarque une bande contaminante de poids moléculaire compatible avec la GST (\approx 35kDa) dans les pistes GST-p85 β et GST-p85 β ΔBH (flèche rouge).

2 - Le domaine BH isolé interagit avec Rac1 endogène

Pour étudier l'interaction entre Rac1 et p85, nous avons réalisé des expériences de précipitation sélective sur des lysats cellulaires, en utilisant comme sonde les protéines de fusion GST-BH α ou GST-CRIB_(PAK). Nous montrons que la protéine de fusion GST-BH α est capable de précipiter Rac1 endogène (*Figure 40*). Le contrôle de précipitation réalisé avec la protéine GST-CRIB_(PAK), montre une précipitation beaucoup (au moins 10 fois) plus

importante. Ces expériences montrent que le BH α isolé est capable de lier Rac1. Des expériences similaires vont être effectuées avec le domaine BH β .



Figure 40 : Le domaine BH α interagit avec Rac1. Les protéines de lysats de cellules A20 (non adhérentes) sont précipitées avec les sondes GST-BH α ou GST-CRIB_(PAK) puis migrées sur gel de polyacrylamide et révélées en western blot avec un anticorps anti-Rac.

IV - Discussion

La régulation de la survie cellulaire est un mécanisme complexe très contrôlé, qui fait intervenir de manière active l'adhérence à la matrice extracellulaire et les interactions cellule-cellule. Dans la plupart des types cellulaires, « adhérents », la réduction de ces interactions induit la mort cellulaire par apoptose (anoïkis) (Watton & Downward, 1999; Frisch & Ruoslahti, 1997). Dans ces cellules, il a été montré que la GTPase Rac1 (Coniglio *et al.*, 2001; Cheng *et al.*, 2004) et la kinase Akt (Zugasti *et al.*, 2001; Rul *et al.*, 2002) peuvent conférer une résistance à l'apoptose. Mais il existe d'autres cellules qui sont, par nature, « non adhérentes », comme les lymphocytes, acteurs principaux de la réponse immunitaires qui circulent dans l'organisme, tantôt en suspension dans le sang, tantôt adhérents dans les organes lymphoïdes. Ces observations posent la question des mécanismes qui régulent la survie cellulaire de ces cellules non adhérentes.

1 - La voie Rac1/Akt est restreinte aux cellules non adhérentes

Les travaux antérieurs du laboratoire ont mis en évidence une activation d'Akt dépendante de l'activité de la GTPase Rac1 dans la lignée de lymphocytes T Jurkat en réponse à la stimulation du TCR (T Cell Receptor) (Genot *et al.*, 2000). L'utilisation des lignées RBL 2H3 (mastocytes) et A20 (lymphocytes B), dont la population est mixte, avec une composante adhérente et une composante non adhérente, nous a permis de mettre en évidence que l'activation d'Akt induite par Rac1-GTP dans ces cellules est restreinte à la composante non adhérente (Figure 23 (page 90) et Figure 34 (page 112)). L'étape suivante de la caractérisation de cette voie de signalisation est la validation de nos résultats avec les protéines endogènes. Le modèle A20 nous semble idéal pour cette étude (population mixte, fort taux d'expression des protéines d'intérêt, origine murine (accès aux séquences publiées dans les banques de données pour générer des siRNA)).

2 - SHIP régule négativement la voie Rac1/Akt dans les cellules adhérentes

La PI-Phosphatase SHIP est principalement régulée par modifications de sa localisation cellulaire (Phee *et al.*, 2000). Le recrutement de SHIP sur les sites de génération des $PI_{(3,4,5)}P_3$ est suffisant pour induire une diminution de l'activité d'Akt (Carver *et al.*, 2000). Dans nos expériences avec les lignées DT40 sauvage et SHIP-déficiente (SHIP^{-/-}), nous avons pu observer que l'absence de SHIP augmente le niveau basal de phosphorylation d'Akt en T³⁰⁸ et S⁴⁷³ (Figure 22B (page 89)), conformément aux données publiées (Liu *et al.*, 1999).

Une des hypothèses envisagées pour expliquer la spécificité de l'activation d'Akt par Rac1 aux cellules non adhérentes, propose l'existence d'une inhibition de cette voie induite par l'adhérence. Nos résultats indiquent que SHIP pourrait jouer un rôle dans une telle voie d'inhibition. On sait que dans les cellules adhérentes, les Intégrines sont engagées avec leur ligand et forment des adhérences focales qui induisent la phosphorylation de nombreuses protéines sur résidus Tyrosines. Parmi ces protéines, on peut citer p130^{CAS}, dont les Tyrosines phosphorylées permettent le recrutement de SHIP2 (Prasad *et al.*, 2001; Nojima *et al.*, 1995) et SHIP1 (Figure 36B (page 115)) via leur domaine SH2. Cet adaptateur entre les adhérences focales et le cytosquelette d'actine, peut être considéré comme une plateforme de signalisation empêchant l'activation d'Akt par la Rac1 dans les cellules adhérentes. La perte de l'adhérence a été mis en relation avec une déphosphorylation de p130^{CAS} et un relargage de SHIP (Nojima *et al.*, 1995). Dans notre effort pour évaluer cette hypothèse, nous avons pu montrer que la localisation membranaire de SHIP diminue dans les cellules non adhérentes (Figure 25B (page 93) et Figure 36A (page 115)) et que cette diminution est corrélée avec une diminution de la quantité de p130^{CAS} (phosphorylée et total) dans la fraction membranaire (Figure 36A (page 115)). La poursuite de cette étude passe par la validation des résultats obtenus sur les cellules DT40, par une extinction de SHIP, voire p130^{CAS} par siRNA dans le modèle A20.

3 - La mise en évidence d'un complexe protéique : Rac/Akt

Notre démarche de caractérisation des mécanismes moléculaires de la voie Rac1/Akt nous ont permis de mettre en évidence une interaction entre V12Rac1 et Akt sous forme phosphorylée (T³⁰⁸ et S⁴⁷³) (Figure 26 (page 94)). Nos expériences de co-immunoprécipitation nous a permis de montrer que l'interaction entre V12Rac1 et Akt est dépendante de la présence d'une activité PI3K fonctionnelle, de la présence du domaine PH et des résidus T³⁰⁸ et S⁴⁷³ d'Akt (Figure 32). Plusieurs hypothèses peuvent être avancées pour expliquer cette interaction.

Le premier est que Rac1 peut interagir directement avec Akt soit en aval, soit en amont de son activation. Cette hypothèse a été évoquée précédemment (page 104). Pour vérifier cette

hypothèse, il nous faudra déterminer avec précision les séquences d'Akt et Rac1 impliquées dans cette interaction, générer des formes mutées sur ces séquences d'Akt et Rac1 et vérifier l'impact de ces mutations sur l'interaction Rac1/Akt.

La seconde hypothèse envisagée est que l'interaction Rac1/Akt n'est pas directe et qu'un intermédiaire interagit avec les 2 protéines. Dans notre voie de signalisation Rac1 est en amont de la PI3K (Genot *et al.*, 2000). Nous avons pu mettre en évidence une interaction entre Akt et p85 Rac1 peut potentiellement interagir avec le domaine BH des sous-unités p85 de la PI3K (Chamberlain *et al.*, 2004). Nous pensons que cette interaction peut être la clé du mécanisme d'activation d'Akt par Rac1. Pour évaluer cette hypothèse nous avons développé une série de mutants des sous-unités p85 α et p85 β . Les résultats préliminaires obtenus grâce à ces outils montrent que Rac1 endogène peut interagir avec le domaine BH α (*Figure 40* (page 119)). Ces expériences vont être poursuivies avec les autres mutants de p85 α et les mutants p85 β .

Section II : Etude de la signalisation de l'IL-15

I - Introduction

L'IL-15 est une cytokine appartenant à la famille de l'IL-2 (Burton *et al.*, 1994 ; Grabstein *et al.*, 1994). Cette famille comprend l'IL-2, l'IL-4, l'IL-7, l'IL-9, l'IL-15 et l'IL-21, qui utilisent toutes dans leurs récepteurs la chaîne γ_c (γ common). Toutes ces cytokines possèdent chacune une chaîne réceptrice α responsable de la spécificité de chaque cytokine (Leonard *et al.*, 1995). En plus de sa chaîne spécifique IL-15R α et de la chaîne γ_c , l'IL-15 partage avec l'IL-2 la chaîne réceptrice IL-2R β (Interleukin 2 Receptor β) (Giri *et al.*, 1994). Ces caractéristiques expliquent la grande redondance des effets de l'IL-2 et l'IL-15 (Burton *et al.*, 1994). Malgré cette redondance, il apparaît de plus en plus clairement que ces cytokines exercent des fonctions différentes *in vivo*. Ainsi, si l'IL-2 est le principal facteur prolifératif des lymphocytes T activés, l'IL-15 est impliquée dans des mécanismes de protection contre l'apoptose dans de nombreux types cellulaires hématopoïétiques (cellules NK (Ranson *et al.*, 2003), lymphocytes T CD8 mémoires (Zuo *et al.*, 2005)) ou non (cellules épithéliales (Yang *et al.*, 2002c), cellules endothéliales (Angiolillo *et al.*, 1997)). Malgré la littérature conséquente concernant cette cytokine, les liens entre la signalisation de l'IL-15 et les Rho GTPases ne sont pas établis. Nous avons exploré la signalisation de l'IL-2 et de l'IL-15 dans le modèle de lignée lymphocytaire T CD8, Kit 225. Nous avons déjà montré que dans ce modèle l'expression de V12Rac1 induit une augmentation de la phosphorylation d'Akt en T³⁰⁸ et S⁴⁷³ (Figure 23A (page 90)). Nous avons donc cherché à savoir si une cytokine telle que l'IL-15 est capable d'induire la voie Rac-Akt.

II - Résultats

A - Les doses et les cinétiques de réponse de l'IL-2 et de l'IL-15 sont différentes

Les cellules de la lignée Kit 225 sont dépendantes de l'IL-2 pour leur croissance en culture (0,5 ng/mL). Afin d'étudier la signalisation des cytokines IL-2 et IL-15, nous avons, dans un premier temps, effectué des tests de prolifération. Pour cela les cellules sont lavées et déprivées en IL-2 pendant 48h, avant d'être remises en culture pendant 72h avec diverses concentrations d'IL-2 et d'IL-15. Cette approche nous a permis de vérifier qu'à la fois l'IL-2 et l'IL-15 sont capables de stimuler la prolifération des cellules Kit 225, mais à des doses différentes pour un effet comparable, de l'ordre de 10 ng/mL pour l'IL-15 contre 1 ng/mL pour l'IL-2 (Figure 41A).

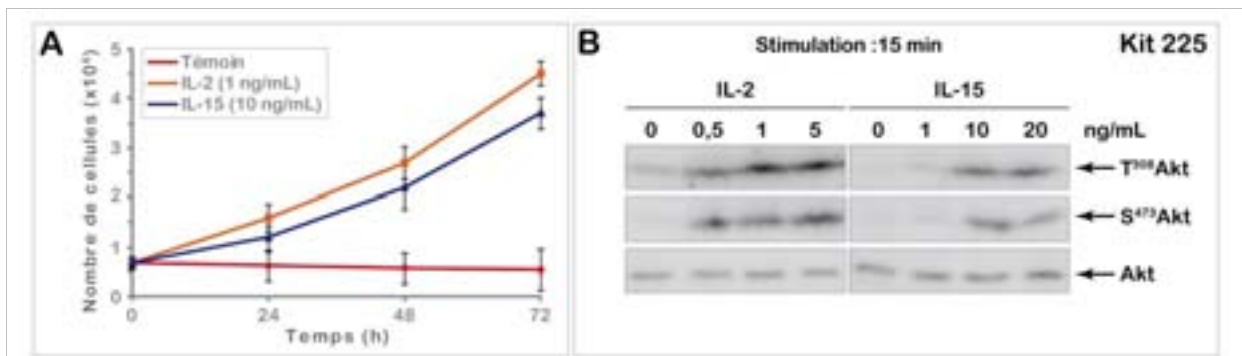
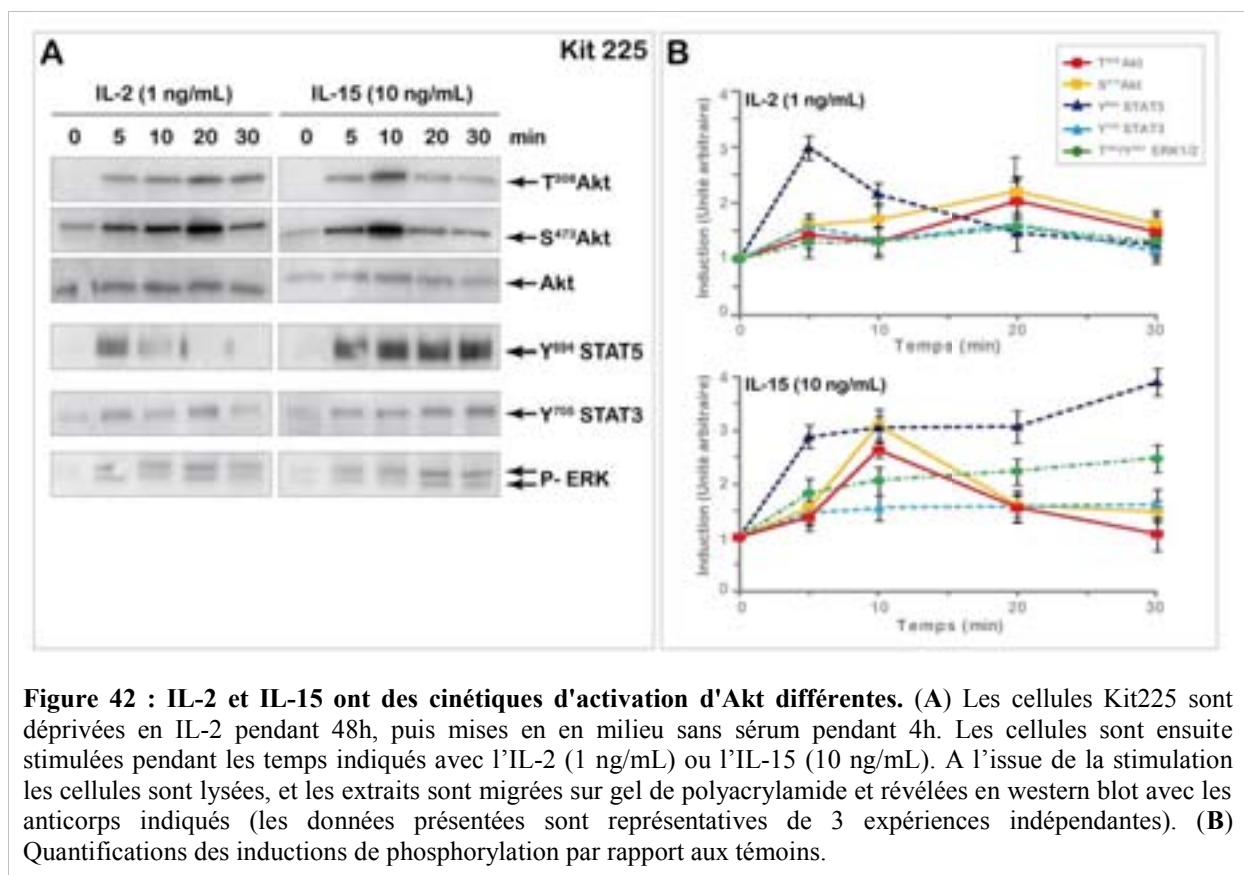


Figure 41 : IL-2 et IL-15 stimulent la croissance cellulaire et la phosphorylation d'Akt mais de façon distincte. (A) Courbes de prolifération des cellules Kit 225 non stimulées, stimulées avec 1 ng/mL d'IL-2, ou avec 10 ng/mL d'IL-15. Les cellules Kit 225 sont déprivées en IL-2 pendant 48h, puis remises en culture avec les doses indiquées de cytokines. Au temps indiqués, les cellules sont homogénéisées et comptées après coloration au bleu trypan (expérience réalisée en triplicate). (B) Les cellules Kit 225 sont déprivées en IL-2 pendant 48h, puis mises en milieu sans sérum pendant 4h. Les cellules sont ensuite stimulées pendant 15 min avec les doses de cytokines indiquées, puis lysées et migrées sur gel de polyacrylamide. La révélation est faite avec les anticorps anti-Akt, anti-T³⁰⁸ Akt et anti-S⁴⁷³ Akt (les données présentées sont représentatives de 2 expériences indépendantes).

Nous avons ensuite cherché à déterminer si ces cytokines sont capables d'induire la phosphorylation d'Akt. Pour cela, nous avons déprivé en IL-2 les cellules Kit 225 pendant 48h, puis en sérum pendant 4h. A l'issue de la déprivation nous avons stimulé les cellules avec différentes doses d'IL-2 et d'IL-15 pendant 15 min. Après lyse, migration sur gel de polyacrylamide et révélation en western blot avec des anticorps anti-Akt, anti-T³⁰⁸ Akt et anti-S⁴⁷³ Akt nous avons pu déterminer que l'IL-2 induit la phosphorylation d'Akt pour une dose de 0,5 ng/mL alors que l'IL-15 induit une réponse d'amplitude similaire pour une dose de 10 ng/mL (Figure 41B). On remarque que dans la gamme de concentration étudiée, l'activation d'Akt par l'IL-2 est dose-dépendante, alors que la réponse induite par l'IL-15 est plutôt de type tout ou rien. La phosphorylation maximale est atteinte à 1 ng/ml pour l'IL2, 10 ng/ml pour l'IL15, nous avons donc choisi de travailler à ces concentrations pour compléter la caractérisation des effets de ces deux cytokines sur Akt.

Pour approfondir cette étude, nous avons examiné la cinétique des phosphorylations d'Akt ainsi que celles de STAT5 (Y⁶⁹⁴) et STAT3 (Y⁷⁰⁵) et ERK (T²⁰²/Y²⁰⁴) qui sont connues pour être activées par l'IL-2 et l'IL-15 (Johnston *et al.*, 1995). En stimulant à différents temps avec, soit IL-2 (1ng/mL), soit l'IL-15 (10 ng/mL), des cellules Kit 225 préalablement déprivées comme précédemment décrit, nous avons mis en évidence des cinétiques d'activation très différentes pour l'IL-2 et l'IL-15, en fonction des molécules concernées (Figure 42). Dans les 2 cas, la phosphorylation d'ERK (T²⁰²/Y²⁰⁴) et de STAT3 (Y⁷⁰⁵) est augmentée à 5 min et le reste jusqu'à 30 min avec un pic d'activation à 20 min. Pour STAT5 (Y⁶⁹⁴) on observe un pic d'activation à 10 min puis une diminution pour l'IL-2 et une

activation dès 5 min qui reste forte jusqu'à 30 min pour l'IL-15. En ce qui concerne Akt, les phosphorylations en T³⁰⁸ et S⁴⁷³ apparaissent dès 5 min et augmentent de manière similaire jusqu'à atteindre un pic à 20 min, avec l'IL-2. Avec l'IL-15, la cinétique est différente, le pic d'activation survenant après 10 min de stimulation. Dans les 2 cas l'expression d'Akt n'est pas modulée (*Figure 42*). Ces différentes cinétiques d'activation peuvent rendre compte des différences observées entre l'IL-15 et l'IL-2 par exemple au niveau de l'activation du facteur de transcription NFAT (Eicher, 2003).



B - L'IL-15 et l'IL-2 induisent l'activation de Rac1, avec des cinétiques différentes

Pour évaluer le rôle de Rac dans la signalisation de l'IL-15 et de l'IL-2 nous avons réalisé des expériences de précipitation sélective avec la sonde GST-CRIB_(PAK). Les cellules sont déprivées et stimulées comme décrit dans le paragraphe précédent. Les 2 cytokines, IL-2 et IL-15 sont capables d'induire l'activation de Rac1, mais avec des cinétiques totalement différentes. Avec l'IL-2, on observe activation de Rac dès 5 min qui augmente jusqu'à 30 min, alors qu'avec l'IL-15 on observe un pic d'activation à 10 puis une diminution jusqu'à 30 min. La cinétique d'activation de Rac1 est identique à celle d'Akt, laissant supposer un lien entre les 2. Nous avons montré que dans ce modèle une surexpression de V12Rac1 induit une

augmentation de la phosphorylation d'Akt en T³⁰⁸ et S⁴⁷³ (Figure 23A (page 90)). Pour définir la place de Rac1 dans l'activation d'Akt nous avons réalisé une stimulation des cellules Kit 225, dans les conditions optimales pour chaque cytokines, IL-2 (1 ng/mL ; 20 min) ou l'IL-15 (10 ng/mL ; 10 min) en présence ou absence de 10 μ M de l'inhibiteur de la PI3K, LY294002. Cette expérience met en évidence que l'activation de Rac1 par l'IL-2 et l'IL-15 est indépendante de l'activité de la PI3K. De plus, l'utilisation d'un inhibiteur de Rac1 (50 μ M) ne modifie pas cette activation. Cet inhibiteur étant spécifique des GEFs Tiam et Trio (Gao *et al.*, 2004), on peut en déduire que ces GEFs ne sont pas impliquées dans l'activation de Rac en réponse à l'IL-2 et l'IL-15. Ces résultats montrent que l'activation d'Akt et de Rac1 suivent une cinétique comparable et que si une relation entre ces 2 événements existe, elle est compatible avec Rac positionné en amont de la PI3K. Pour vérifier, l'hypothèse de la voie Rac/Akt, nous avons tenté d'exprimer une forme dominante négative de Rac1, N17Rac1. Cependant, cette approche n'a pas abouti, car l'expression même transitoire de N17Rac1 dans les cellules Kit 225, induit une létalité de plus de 90%. Il est possible que l'inhibition de Rac1 produise une inhibition d'Akt trop importante pour permettre la survie cellulaire. Une autre approche pour tester cette hypothèse passera par l'extinction de Rac1 par des siRNA, pour vérifier le rôle de Rac1 dans la survie cellulaire et dans la régulation d'Akt.

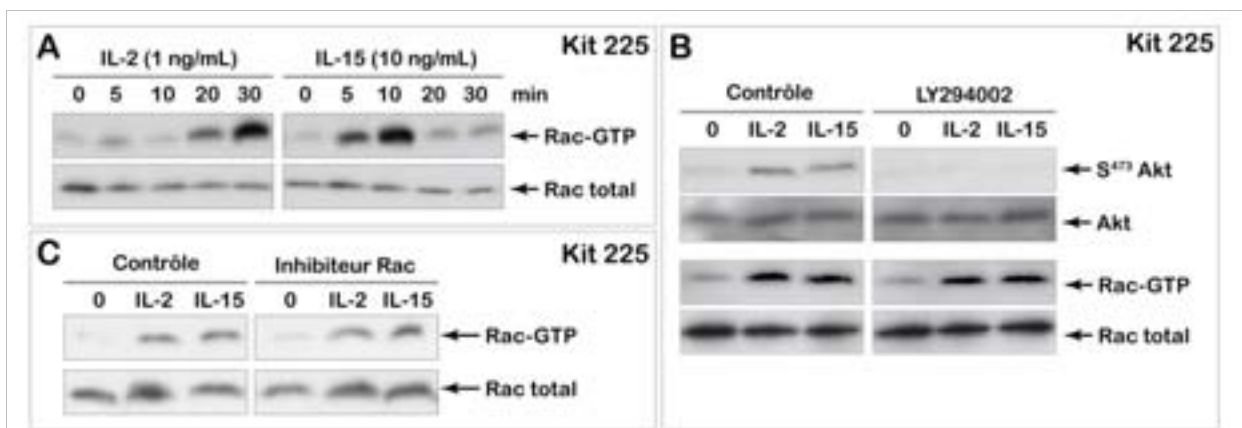


Figure 43 : Rac est activée par l'IL-15 d'une manière indépendante de l'activité de la PI3K. (A) Les cellules Kit 225 sont déprivées en IL-2 pendant 48h, puis mises en milieu sans sérum pendant 4h. Les cellules sont ensuite stimulées pendant les temps indiqués avec l'IL-2 (1 ng/mL) ou l'IL-15 (10 ng/mL). (B) Les cellules Kit 225 déprivées sont stimulées avec l'IL-2 (1 ng/mL, 10 min) ou l'IL-15 (10 ng/mL, 20 min) avec ou sans 10 μ M de LY294002 ou 50 μ M d'inhibiteur de Rac (C). A l'issue de la stimulation les cellules sont lysées, et les extraits cellulaires sont migrés sur gel de polyacrylamide. Les protéines sont révélées en western blot avec les anticorps indiqués (les données présentées sont représentatives de 3 expériences indépendantes).

III - Discussion

L'IL-2 et L'IL-15 sont des cytokines très importantes dans l'homéostasie des lymphocytes T. Il est de plus en plus clair que malgré l'utilisation de 2 chaînes réceptrices communes (IL-2R β et γ C) ces cytokines jouent des rôles différents. L'IL-15 intervenant dans régulation de la survie cellulaire. Nos travaux ont permis de mettre en évidence, *in vitro*, que l'IL-2 et l'IL-15 induisent l'activation d'ERK, de STAT3, de STAT5 et d'Akt de manière différente, montrant que ces 2 cytokines peuvent stimuler des voies de signalisation identiques, mais avec des cinétiques différentes.

Il y a peu de données bibliographiques concernant les GTPases et l'IL-2/IL-15. Cependant, il a été montré qu'une stimulation des cellules Kit 225 pendant 16h induisant l'expression des gènes codant pour Rac1 et Rac2 (Mzali *et al.*, 2005), laissant supposer un rôle des GTPase dans la signalisation de l'IL-2. Nous avons pu mettre en évidence une activation de Rac1 en réponse aux 2 cytokines, mais avec des cinétiques différentes. Plus intéressant, nous avons observé que les cinétiques d'activation d'Akt et Rac1 par l'IL-15 sont comparables et que l'activation de Rac1 est indépendante de l'activité de la PI3K. Ces résultats représentent un faisceau d'arguments compatible avec l'activation d'Akt par Rac1, mais cette hypothèse ne sera validée qu'une fois montrée une relation entre l'extinction de Rac1 et l'activation d'Akt.

Chapitre 2

Rho GTPases et cytosquelette, implication dans une pathologie : la leucémie à Tricholeucocytes

Section I : La leucémie à Tricholeucocytes

I - Physiopathologie de la leucémie à Tricholeucocytes

A - Généralités

La leucémie à tricholeucocytes est un syndrome lymphoprolifératif B chronique rare qui représente environ 2 à 3% de l'ensemble des leucémies (Bernstein *et al.*, 1990; Troussard *et al.*, 1998). Elle se distingue de nombreuses pathologies malignes hématopoïétiques par 2 aspects majeurs. Primo, les cellules pathognomoniques, les tricholeucocytes, présentent des caractéristiques morphologiques et phénotypiques atypiques. Secundo, la maladie est sensible à des thérapies non-conventionnelles telles que l'interféron- α et les analogues de nucléosides. Intuitivement on peut penser que ces 2 aspects soient liés, hors actuellement il n'existe pas de modèle rendant compte de cette dualité.

L'étude présentée dans ce chapitre apporte un début de réponse à cette interrogation en mettant en relation les particularités morphologiques des tricholeucocytes, les GTPases de la famille Rho, la protéine p53, ainsi que les effets du traitement à l'interféron- α sur cette morphologie.

B - Aspect clinique de la pathologie

La leucémie à Tricholeucocytes touche une population essentiellement masculine (75 à 80%) de 50-60 ans. Les signes cliniques principaux sont une splénomégalie (90% des cas), une anémie, diverses cytopénies: monocytopénie (100%), thrombocytopénie (90%), neutropénie (80%) et la présence de tricholeucocytes dans le sang et/ou la moelle osseuse (Allsup & Cawley, 2004). Les symptômes observés sont en grande partie dus à un envahissement de la rate et de la moelle osseuse par les cellules pathognomoniques. Mais contrairement aux autres pathologies malignes affectant la lignée lymphocytaire B, les tricholeucocytes n'envahissent pas les ganglions (Mercieca *et al.*, 1992).

C - Biologie de la cellule pathognomonique : le Tricholeucocyte

1 - Les Tricholeucocytes présentent une morphologie atypique

La leucémie à tricholeucocytes a été décrite pour la première fois en 1958 par Bouroncle *et al.* comme une réticulo-endothéliose leucémique (Bouroncle *et al.*, 1958). Le terme de «hairy cell leukemia», apparu en 1966 (Schrek & Donnelly, 1966), fait référence à la morphologie atypique des tricholeucocytes qui présentent à leur surface de nombreuses projections cytoplasmiques, qui leurs donnent un aspect «chevelu». Ainsi contrairement aux cellules B normales et à d'autres leucémies lymphocytaires chroniques, le cytosquelette

cortical des tricholeucocytes est très actif et la majorité de l'actine cellulaire est sous forme fibrillaire au niveau cortical (Caligaris-Cappio *et al.*, 1986). De plus, nos observations montrent que les tricholeucocytes, primaires ou issus de lignée, possèdent une très grande motilité et un réarrangement du cytosquelette très rapide.

2 - Le phénotype des Tricholeucocytes

Les tricholeucocytes sont des cellules B matures anormales présentant un phénotype de cellule B activée à un stade de maturation pré-plasmocytaire (Burthem *et al.*, 1997)(Lodolce *et al.*, 1998). En effet outre leur morphologie atypique, les tricholeucocytes expriment à leurs surface des marqueurs de cellules B matures tels que le CD19, CD20 (Genot *et al.*, 1991), CD22, CD40 (Burthem *et al.*, 1997), ainsi que la SIg (Surface light-chain-restricted Immunoglobulin) associée à un ou plusieurs isotypes de chaîne lourde (Burns *et al.*, 1978; Forconi *et al.*, 2001). Malgré leur état de maturation avancé, les tricholeucocytes, sont incapables de se différencier en plasmocytes (Pettitt *et al.*, 1999). Les marqueurs spécifiques de la leucémie à tricholeucocytes sont le CD103, le CD25 (IL-2R α), le CD11_C (chaîne α_X de l'intégrine $\alpha_X\beta_2$) (Cornfield *et al.*, 2001) et mis en évidence plus récemment de l'annexine A1 (Falini *et al.*, 2004).

Outre ces marqueurs spécifiques les tricholeucocytes expriment aussi diverses molécules d'adhérence (intégrines, CD44), des cytokines et divers oncogènes. L'ensemble des molécules exprimées par les tricholeucocytes permet d'expliquer bon nombre de leurs propriétés au sein des tissus.

3 - Les anomalies chromosomiques et mutations génétiques impliqués dans la HCL

Un grand nombre d'anomalies chromosomiques ont été décrites à partir de malades souffrant de leucémies à tricholeucocytes, mais aucune d'elle n'est vraiment spécifique de la pathologie. En effet, il s'agit d'anomalies communes à de nombreuses pathologie leucémiques B (Sambani *et al.*, 2001). On peut toutefois remarquer que les anomalies impliquant le chromosome 5 (numériques (trisomies), ou structurales) sont présentes dans 30 à 40% des cas étudiés, alors qu'elles sont rares dans les autres leucémies B (Wu *et al.*, 1999).

Malgré ce grand nombre d'anomalies chromosomiques décrites dans le cadre de la leucémie à tricholeucocytes, peu d'anomalies génétiques sont connues. Les plus importantes sont des mutations du suppresseur de tumeur p53 dans 1/3 des cas (Konig *et al.*, 2000) et de BCL6 dans 25% des cas (Capello *et al.*, 2000). Les rôles de ces mutations dans la pathologie ou son maintien ne sont, à ce jour, pas éclaircis. Ainsi, bien que de nombreuses anomalies

cytogénétiques aient été décrites, l'événement oncogénique sous-jacent à la pathologie n'a pas encore été clairement identifié.

II - Les traitements de la Leucémie à Tricholeucocytes

A - La splénectomie

A l'origine, le traitement de la leucémie à tricholeucocytes était la splénectomie. Cette approche permettait une amélioration, voire une normalisation de la formule sanguine chez 40 à 75% des patients, et un taux de survie à 5 ans de 60 à 70% (Jansen & Hermans, 1981; Van Norman *et al.*, 1986). Cependant, les réponses à ce traitement sont variables, les cytopénies résultant de l'envahissement de la moelle osseuse par les tricholeucocytes. De plus le taux de rechute est très important.

B - L'interféron- α (IFN- α)

C'est au milieu des années 80 que l'IFN- α (Intron A[®]) a été introduit dans le traitement des patients atteints de la leucémie à tricholeucocytes, (Quesada *et al.*, 1984) permettant une réponse partielle au traitement chez 70% des malades (Grever *et al.*, 1995) et un taux de survie à 5 ans de près de 90% (Berman *et al.*, 1990).

Les mécanismes par lesquels l'IFN- α entraîne la rémission de la maladie ne sont toujours pas élucidés. Cependant, il est admis que l'effet observé résulte majoritairement d'un effet direct de l'IFN- α sur les tricholeucocytes (Vedantham *et al.*, 1992), qui expriment le récepteur de l'IFN- α (Platanias *et al.*, 1992). Sur cette base plusieurs études *in vitro* ont fait émerger différents modèles de régulation de la leucémie à tricholeucocytes par l'IFN- α tels qu'un effet antiprolifératif direct de l'IFN- α sur les tricholeucocytes (Paganelli *et al.*, 1986), une modulation des marqueurs phénotypiques des tricholeucocytes (Gamliel *et al.*, 1990), une différenciation cellulaire (Michalevich & Revel, 1987), ou un blocage de boucles de régulation autocrines (Heslop *et al.*, 1991). Plus récemment, le groupe de Cawley a mis en évidence *in vitro* que l'élimination des tricholeucocytes induite par l'IFN- α mettait en jeu un mécanisme de sécrétion autocrine de TNF- α et une sensibilisation des cellules à l'effet pro-apoptotique de celui-ci via une inhibition de l'expression d'inhibiteurs de l'apoptose (Baker *et al.*, 2002).

Actuellement, du fait de la durée du traitement, des effets secondaires (syndrome grippal) et de la partialité des résultats l'IFN- α n'est plus le traitement préférentiel de la leucémie à tricholeucocytes. Mais il reste utilisé dans de nombreux cas, et semble très efficace

en association avec les traitements de nouvelle génération que sont les analogues de purines (Habermann *et al.*, 1992).

C - Les analogues de purines

Depuis le début de années 90, 2 analogues de purines sont utilisés dans le traitement de la leucémie à tricholeucocytes : la 2'-déoxycoryformycine (dCF, Pentostatin, Nipent[®]), la 2-chlorodéoxyadénosine (2-CdA, Cladribine, Leustatin[®]). Les analogues de purines entraînent une rémission complète chez 85 à 90% des malades traités et un taux de survie à 5 ans de 85-90% (Dearden *et al.*, 1999; Saven *et al.*, 1998).

Les mécanismes d'action de ces molécules ne sont pas totalement éclaircis, mais on sait qu'elles perturbent le métabolisme des purines induisant l'accumulation de produits non métabolisables qui entraînent la mort cellulaire. On sait aussi que les cellules lymphoïdes y sont particulièrement sensibles (Riscoe *et al.*, 1989). Ces molécules sont des agents immunosuppresseurs (Beutler, 1992; Cassileth *et al.*, 1991) qui entraînent des lymphopénies B et T pendant 6 à 18 mois après le traitement, ouvrant la voie à des pathologies opportunistes.

D - Immunothérapies

Malgré les bons résultats de l'IFN- α et surtout des analogues de purines, certains patients restent réfractaires aux traitements. C'est dans ce cadre que des immunothérapies ont été développées. Ces thérapies utilisent des anticorps monoclonaux plus ou moins modifiés pour cibler les tricholeucocytes.

Section II : Article 2

“Rho GTPases and p53 are involved in the morphological appearance and IFN α response of hairy cells”

Benjamin CHAIGNE-DELALANDE, Lynda DEUVE, Edith REUZEAU, Caroline BASONI, David LAFARGE, Christine VARON, Florence TATIN, Gueric ANIES, Richard GARAND, IJsbrand KRAMER and Elisabeth GÉNOT

American Journal of Pathology 2006 Feb;168(2):562-73.

Tumorigenesis and Neoplastic Progression

RhoGTPases and p53 Are Involved in the Morphological Appearance and Interferon- α Response of Hairy Cells

Benjamin Chaigne-Delalande,* Lynda Deuve,* Edith Reuzeau,* Caroline Basoni,* David Lafarge,* Christine Varon,* Florence Tatin,* Gueric Anies,* Richard Garand,[†] Ijsbrand Kramer,* and Elisabeth Génot*

From Unité 441,* Institut National de la Recherche Médicale, University Victor Segalen Bordeaux, Bordeaux, and the European Institute of Chemistry and Biology, University of Bordeaux I, Talence; and the Laboratoire d'Hématologie,[†] Institut de Biologie, Centre Hospitalier Universitaire, Nantes, France

Hairy cell leukemia is an uncommon B-cell lymphoproliferative disease of unknown etiology in which tumor cells display characteristic microfilamentous membrane projections. Another striking feature of the disease is its exquisite sensitivity to interferon (IFN)- α . So far, none of the known IFN- α regulatory properties have explained IFN- α responsiveness nor have they taken into account the morphological characteristics of hairy cells. IFN- α profoundly alters cytoskeletal organization of hairy cells and causes reversion of the hairy appearance into a rounded morphology. Because cytoskeletal rearrangements are controlled by the Rho family of GTPases, we investigated the GTPase activation status in hairy cells and their regulation by IFN- α . Using immunolocalization techniques and biochemical assays, we demonstrate that hairy cells display high levels of active Cdc42 and Rac1 and that IFN- α down-regulates these activities. In sharp contrast, RhoA activity was low in hairy cells but was increased by IFN- α treatment. Finally, IFN- α -mediated morphological changes also implicated a p53-induced response. These observations shed light on the mechanism of action of IFN- α in hairy cell leukemia and are of potential relevance for the therapeutic applications of this cytokine. (*Am J Pathol* 2006, 168:562-573; DOI: 10.2353/ajpath.2006.050315)

Hairy cell leukemia (HCL) is a B-cell tumor affecting the preplasma stage of B-cell differentiation.¹ Although HCL is rare, this disease has been the subject of intense investigation because of its remarkable responsiveness to low-dose interferon (IFN)- α therapy. Most studies on HCL have focused on the profile of cell surface markers for classification purposes and to attempt to understand the unique sensitivity of hairy cells to IFN- α . However, alterations in the expression pattern of hairy cell surface molecules do not correlate with IFN- α sensitivity. In addition, none of the multiple known IFN- α regulatory properties can account for IFN- α responsiveness. Lastly, the proposed mechanisms of action of IFN- α in the disease do not take into account the phenotypic characteristics of hairy cells. These data suggest that IFN- α may target a specific defect in hairy cells and implies that the function and regulation of intracellular signaling molecules must be explored in these cells.

The immense progress in the understanding of cytoskeletal organization accomplished in the last decade has led us to consider the effects of IFN- α on hairy cell morphology. In various models, cytoskeletal dynamics have been shown to be driven by small G-protein members of the Rho family, a subclass of the Ras superfamily of which RhoA, Rac1, and Cdc42 are the best characterized members.² RhoGTPases cycle between an inactive GDP-bound and an active GTP-bound form.³ GTP-bound GTPases have the ability to interact with and thereby

Supported by grants from the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale; University of Bordeaux 1 and 2; GEFLUC; the Fondation pour la Leucémie; and fellowships from the Délégation Générale pour l'Armement (to B.C.); the Fondation pour la Recherche Médicale (to B.C.-D. and C.B.); and the French Ministry of Education, Research, and Technologies (to C.V. and G.C.).

Accepted for publication September 27, 2006.

Current address of L.D.: Stellenbosch University, Department of Zoology, Private Bag X1, Matieland 7602, South Africa.

Current address of D.L.: Laboratoire de Biogénèse Membranaire, CNRS, Université Bordeaux 2, Bordeaux, France.

Address reprint requests to Elisabeth Génot, Unité INSERM 441, European Institute of Chemistry and Biology, 2, rue Robert Escarpit, 33 800 Pessac, France. E-mail: e.genot@iec.u-bordeaux.fr.

activate downstream targets, so called effectors.⁴ Guanine exchange factors (GEFs) catalyze the exchange of GDP for GTP and hence activate the GTPases whereas GTPase-activating proteins (GAPs) enhance the intrinsic GTPase activity, returning the GTPases under their basal GDP-bound state.³ Alternatively, specific alterations of the GTPases such as point mutations on key residues or covalent modifications by bacterial toxins, prevent nucleotide exchange or GTP hydrolysis and thereby lock the GTPase in one conformation or the other. Dominant-negative mutants act by sequestering GEFs, making them unavailable to endogenous GTPases when a stimulus is provided.

The actin cytoskeleton is composed of polymerized actin monomers (filamentous actin: F-actin) that can be rearranged into discrete configurations. Most studies have been performed in adherent cells, which undergo striking morphological changes and actin remodeling on RhoGTPase activation.⁵ Thus, RhoA regulates the formation of stress fibers, Rac1 regulates the formation of lamellipodia, a fine protrusive meshwork of actin filament at the leading edge of migrating cells, whereas Cdc42 regulates the formation of filopodia, finger-like protrusions, as well as cell polarity.⁵ Recent work revealed the role of RhoGTPases in hematopoietic cells.^{6,7} There is a great deal of interest in these proteins because in addition to their effects on the cytoskeleton, they control gene transcription and cell-cycle progression.^{8,9} RhoA, Cdc42, and Rac1 control the activity of the serum response element¹⁰ whereas elevated levels of monomeric actin decreases serum response factor activities.¹¹ Cell survival is also regulated by RhoGTPases. In this respect, Rac1 has recently received much attention when it was shown that constitutively active Rac1 could protect from cell death induced by various apoptosis inducers.¹²⁻¹⁴

The tumor suppressor p53 is functionally connected to the RhoGTPase pathways.¹⁵ Moreover, p53 has recently been shown to be a regulator of cell morphology when it was shown that p53 null fibroblasts exhibit constitutive Cdc42-dependent membrane cytoplasmic extensions and that ectopic overexpression of p53 could antagonize their formation.¹⁶ IFN- α has recently been shown to suppress oncogene-induced transformation through p53,¹⁷ prompting us to examine the role of p53 in hairy cell morphology.

The coupling of cytoskeletal organization to cell cycle regulation suggests that cytoskeletal integrity is determinant in the proper control of cell-cycle progression and survival.¹⁸ Because hairy cells present defects in the regulation of their cell cycle as well as alterations in their cytoskeleton, we hypothesized that RhoGTPases may play a role in the phenotypic aspect of hairy cells and could be involved in the response to IFN- α . We have explored the activity of RhoGTPases in hairy cells and examined the effect of IFN- α on this parameter. Because of the limited availability of fresh hairy cells and to their poor growth *in vitro*, such studies cannot be performed with primary hairy cells but can be achieved with suitable cell lines. In this study, two hairy cell lines derived from patients with HCL responsive to IFN- α were used, HCLL-7876¹⁹ and Eskol.²⁰ Two experiments were performed on

primary cells from one patient to confirm our observations. Our results demonstrate that RhoGTPases contribute to their cytoskeletal defects. In addition, IFN- α targets p53 and RhoGTPases to induce cellular responses that could be of prime importance in the therapeutic benefits of IFN- α in HCL.

Materials and Methods

Cells and Culture Conditions

The HCL cell lines HCLL-7876 was obtained from Dr. Christel Uittenbogaart (University of California at Los Angeles, Los Angeles, CA) and Eskol from Dr. Milton Taylor (Indiana University, Bloomington, IN). Their characterization has been reported in the context of other studies.^{19,20} Fresh hairy cells were collected after written informed consent was given, in accordance with the rules and tenets of the revised Helsinki protocol, and cells were isolated as previously described.^{21,22} All cells were maintained in RPMI 1640 supplemented with glutamine, antibiotics (Gibco BRL, Grand Island, NY), and 10% fetal calf serum (Globepharm, Surrey, UK).

Plasmids and Cell Transfection

p53 and various GTPase mutants were expressed as GFP fusion proteins encoded by eukaryotic expression vectors provided by Drs. P. Roux (CRBM/CNRS UPR1086, Montpellier, France) (pEGFP-p53 and pEGFP-p53H175R) and P. Fort (CRBM/CNRS UPR1086, Montpellier, France) (pEGFP-GTPase mutants). All plasmids were purified by equilibrium centrifugation in CsCl-ethidium bromide gradients using standard procedures. Cells were transfected by electroporation (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). Briefly, 10 million cells/0.5 ml were pulsed in complete medium at 960 μ F and 310 V with 30 μ g of plasmid and cultured for 24 hours to allow plasmid expression. For *Clostridium botulinum* C3 exoenzyme intoxication, hairy cells were treated with 50 μ g/ml Tat-C3 for 18 hours.²³ Plasmids encoding GST-Rho-binding domain (RBD)-rhotekin and GST-Cdc42/Rac-interactive binding domain (CRIB)-PAK have been described elsewhere.²⁴

Reagents and Antibodies

Human recombinant IFN- α 2b (IntronA, Schering Plough) was reconstituted in phosphate buffered saline and used at a final concentration of 1000 UI/ml for HCLL-7876 and 6000 UI/ml for Eskol.^{20,21} Mowiol 4-88 was from Calbiochem. Etoposide was from American Pharmaceutical Partner Inc. (USA) and used at a concentration of 20 μ mol/L unless otherwise indicated. Glutathione-Sepharose beads and various chemicals were from Sigma (St. Louis, MO). Tat-C3 was kindly supplied by Dr. J. Bertoglio (U461-INSERM, Chatenay-Malabry, France). Rhodamine-labeled phalloidin and fluorescein isothiocyanate-labeled secondary antibodies were purchased from Molecular Probes, Eugene, OR. Anti-RhoA and anti-p53

were purchased from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA), anti-Rac1 from Upstate Biotechnology (Lake Placid, NY), anti-CD20 from Serotec, anti-Cdc42 and anti-phospho-p53 antibodies from Transduction Laboratories (Lexington, KY). Peroxidase-labeled antibodies and chemiluminescence reagents were from Amersham International (Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, UK).

Immunofluorescence Microscopy

Studies were performed on suspended cells that were fixed with 3% paraformaldehyde prepared in cytoskeletal buffer (10 mmol/L morpholine ethanesulfonic acid, 150 mmol/L NaCl, 5 mmol/L EGTA, 5 mmol/L MgCl₂, and 5 mmol/L glucose, pH 6.1) for 10 minutes at room temperature, sedimented on poly-L-lysine-coated glass coverslips, and processed for immunofluorescence as previously described.²⁴ The coverslips were mounted on microscope slides with Mowiol 4-88 mounting medium. The hairy phenotype was considered suppressed only when F-actin-stained cells displayed no residual protrusion. Analysis of cytoskeletal alterations was assessed in three independent experiments in which at least 100 cells were counted. Confocal images were obtained by means of a confocal laser microscope system Nikon EclipseE800 (Amsterdam, The Netherlands), equipped with a $\times 60$ objective and driven by EZ2000 software. Each image was acquired sequentially using the appropriate filter sets and processed for publication using Adobe (San Jose, CA) Photoshop CS Software.

Separation of Membrane and Cytosol Fractions

The peculiar hairy cell membranes have led us to adapt a conventional fractionation protocol to optimize the preparation of membrane fractions. Cells were treated with IFN- α for 18 hours or left untreated, washed, and resuspended in hypotonic buffer containing 10 mmol/L Tris-HCl, pH 7.4, 1.5 mmol/L MgCl₂, 5 mmol/L KCl, supplemented with 1 mmol/L dithiothreitol, 0.2 mmol/L orthovanadate, 1 mmol/L 4-(2-aminoethyl) benzenesulfonyl fluoride, 1 μ g/ml aprotinin, and 1 μ g/ml leupeptin. The suspension was homogenized with 30 strokes in a Dounce homogenizer and gently centrifuged to remove unbroken cells and nuclei. The remaining supernatant was centrifuged at 14,000 $\times g$ for 30 minutes at 4°C, and the supernatant was collected as the cytosol fraction whereas pellets were resuspended in hypotonic buffer and collected as the membrane fraction. Protein concentrations were measured and equal quantities were loaded on gels and analyzed by Western blot using standard protocols. The amount of proteins detected by Western blotting was determined by scanning the autoradiogram followed by processing of the data with the NIH image software.

Rho, Rac, and Cdc42 Activity Assays

The RhoA, Rac1, and Cdc42 activity assays are based on the Rap1 activity assays²⁵ and were performed essentially as described in published protocols.^{26,27}

Effect of Etoposide on Hairy Cell Viability

Cell viability was determined using trypan blue exclusion assay. A total of 25×10^4 cells were seeded in 48-well plates and exposed to etoposide at the concentration specified or vehicle concentration alone. After 18 hours, cells were stained with trypan blue, and those excluding or including the dye were scored as alive or dead cells, respectively. Each point was performed in triplicate and 100 cells were scored for each condition.

Statistics

Data are expressed as the mean \pm SD of at least three independent triplicate experiments. Significance was determined using the Student's *t*-test.

Results

F-Actin Phenotype of Hairy Cells and Alterations by IFN- α

To explore the overall cytoskeletal organization of hairy cells and the ability of IFN- α to alter this phenotype, polymerized actin was stained with rhodamine-labeled phalloidin and observed by confocal microscopy. Cells from HCLL-7876 and Eskol cell lines showed the same surface features as those isolated from malignant B cells from patients with HCL (primary cells, PR) (Figure 1). Most cultured hairy cells displayed an irregular profile, with a mixed phenotype made of both extended polymerized actin filaments organized in long protrusions and broader lamellipodium-like structures made up of a dense and compact mass of F-actin. Some cells exhibited thin and curved microspikes made up of long bundles of F-actin on the entire surface of the cell (Figure 1A). Other cells displayed shorter, finger-like protrusions highly reminiscent of filopodia (data not shown). In some instances (~20% of the cells), cultured hairy cells displayed extreme polarization of their surface projections (Figure 1B). These structures correspond to the cytoplasmic projections and broad-based ruffles described previously by means of scanning electron microscopy.²⁸ This apparent heterogeneity is likely to reflect cytoskeletal dynamics.²⁹ Treatment of hairy cells with IFN- α smoothed cell surface outlines. A complete disappearance of these cytoplasmic hair-like projections was observed in ~80% of HCLL-7876 or Eskol cells after 4 days of treatment, in accordance with previous findings.²⁹ However, blunting of surface projections was already evident in ~40% of HCLL-7876 or Eskol cells after 18 hours of treatment or in primary hairy cells from a patient (Figure 1C), when other major effects of IFN- α are already

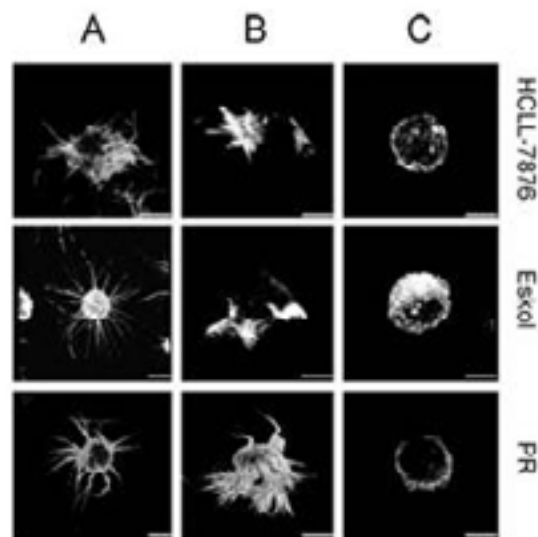


Figure 1. Cytoskeleton of hairy cells and alterations by IFN- α . HCLL-7876 and Eskol cells were either left untreated or incubated in the presence of IFN- α for 18 hours. Cells were harvested, fixed, and sedimented on poly-L-lysine-coated coverslips to be analyzed for F-actin with rhodamine-phalloidin staining. For both cell lines HCLL-7876 and Eskol and primary cells (PR), most untreated cells exhibited thin and curved microspikes made up of long bundles of F-actin on the entire surface of the cell (A) whereas other cells displayed extreme polarization of their surface projections (B). C: Treatment of hairy cells with IFN- α smoothed cell surface outlines. Images are three-dimensional reconstructions of stacks of confocal images. Scale bar, 4 μ m.

detectable.^{20,21} These morphological alterations obviously reflect IFN- α -induced changes in the cytoskeletal proteins.

Changes in RhoGTPase Activities Correlate with Changes in Hairy Cell Appearance

To explore the possibility that alteration in RhoGTPase activities may underlie the abnormal cytoskeleton configuration of hairy cells, experiments were designed to inhibit these activities individually. In most cell types, expression of dominant active form of Cdc42 (V12Cdc42 or L61Cdc42) induces the formation of cytoplasmic extensions and is associated with cell polarization,⁶ suggesting that Cdc42 could be involved in the formation of cellular protrusions in hairy cells. Endogenous Cdc42 activity can be inhibited by overexpressing the dominant-negative form of Cdc42, N17Cdc42, which traps Cdc42's guanine nucleotide exchange factor (GEF) and renders them unavailable for signaling functions. Another way to inhibit Cdc42-driven pathways is to block Cdc42 signaling to effectors. The formation of filopodia is dependent on the interaction of Cdc42 with the structural protein WASP^{27,22} (a protein defective in the Wiskott-Aldrich syndrome). Overexpressing only the CRIB domain of WASP prevents functional interaction of endogenous WASP with Cdc42 and thereby WASP-dependent filopodia formation.¹⁹

Once a transient transfection procedure was successfully established for HCLL-7876 cells (Eskol cells were found completely refractory to transfection), we pro-

ceeded to determine how hairy cells respond to inhibition of Cdc42. A GFP-tagged version of dominant-negative Cdc42 (GFP-N17Cdc42) was used to selectively examine cells that express the plasmid. Cytoskeletal alterations were visualized by rhodamine-phalloidin staining after cells had been sedimented on poly-L-lysine matrix-coated glass coverslips, 24 hours after transfection. After control transfection of a GFP-encoding vector, hairy cells were sometimes slightly more rounded than their control untransfected counterpart, with shorter microspikes and lamellipodia (see bottom of Figure 2C). We routinely observed 33% (\pm 5%) transfected cells with 6% (\pm 3%) smooth cells among the transfected cells. This low unspecific cell smoothing effect appeared in response to the electroporation method and not to the empty plasmid because electroporation in the absence of vector produced the same effect. To ease the analysis, this baseline ratio was arbitrarily counted as one. Inhibition of Cdc42 resulted in a decrease in both the size and density of microspikes in most of the transfected cells (Figure 2A). Quantitative analysis of N17-Cdc42-transfected cells showed 4.4 times more cells with a rounded morphology than the control (Figure 2B). The WASP-CRIB protein appeared as an even better inhibitor with six times more round cells among the transfected cells (Figure 2B). By contrast, transfection of a constitutively active mutant of Cdc42 (GFP-V12Cdc42 or GFP-L61Cdc42) accentuated the phenotype in all of the transfected cells. These cells exhibited longer and stronger spikes, together with a more intense actin staining (Figure 2C). Taken together, these results indicate that a Cdc42-WASP pathway (or a closely related GTPase, able to interact with WASP) is highly active in these cells and that inhibition of its activity corrects the aberrant cytoskeletal organization of the cells.

Because hairy cells also exhibit lamellipodia-like protrusions characteristic of cells harboring active Rac1 proteins, similar experiments were performed with Rac mutants. Expression of dominant-negative Rac1 (GFP-N17Rac1) significantly altered the hairy appearance with suppression of lamellipodia, decreased cortical actin staining, and reduced microspike length and density (data not shown), leading to a phenotype somewhat resembling Cdc42 inhibition. It is likely that inhibition of Rac1 interferes with the pathways involved in the aberrant cytoskeletal organization. Expression of dominant active Rac1 (V12Rac) did not induce any significant change in the overall cell morphology (Figure 2B), suggesting that Rac1 activity was already elevated in these cells.

A balance between Cdc42 and RhoA activities has been evidenced in several models²⁴ and therefore RhoA activity was also investigated. To inhibit Rho, a slightly different approach was used: cells were transfected with a plasmid encoding C3, a well-characterized bacterial toxin that specifically ADP-ribosylates Rho proteins, thereby inactivating them.²⁵ Several attempts to express C3 resulted in hairy cell death, suggesting that hairy cells could not survive inhibition of Rho proteins. An alternative milder treatment, consisting of the addition of recombinant fusion protein Tat-C3, was tested. Such treatment

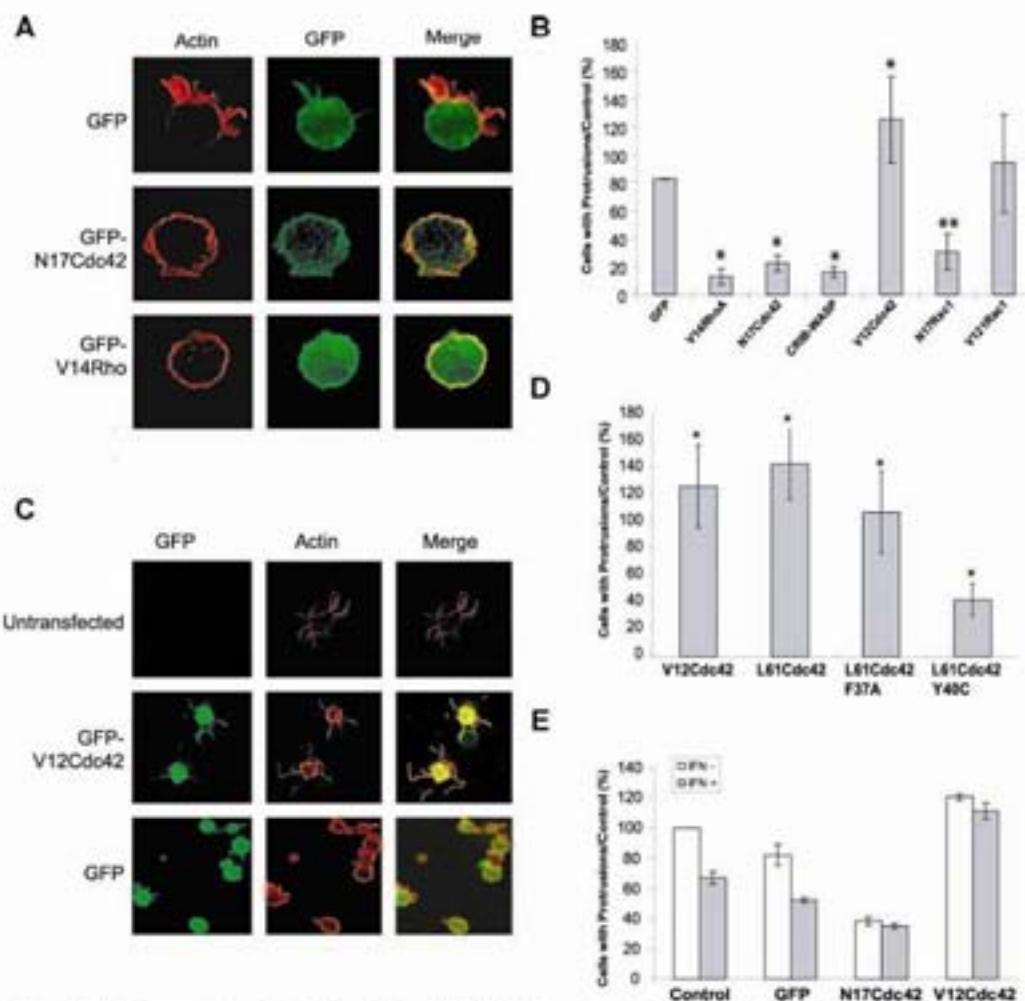


Figure 2. Effects of RhoGTPase mutants on hairy cell morphology. HCLL7876 cells were transiently transfected with a plasmid encoding either control GFP or GFP-tagged versions of RhoGTPase mutants. Twenty-four hours after transfection, cells were harvested, fixed, and analyzed for F-actin with rhodamine-phalloidin staining and examined for morphological alterations by confocal microscopy. Transfection efficiency was found very similar for all plasmids (data not shown). **A.** Expression of N17Cdc42 or V14RhoA inhibited cell protrusions (each image represents one confocal section of a cell). **B.** A quantitative analysis of the morphological alterations induced by RhoGTPase mutants is shown. The hairy phenotype was considered suppressed only when F-actin-stained cells displayed no residual protrusions. Loss of cellular protrusions was calculated on the basis of the control response obtained on transfection of the GFP encoding vector (*statistical significance of the loss of protrusions versus control, $P < 0.01$, **significant difference versus N17Cdc42, $P < 0.05$). Inhibition of Cdc42 or Rac, or expression of active RhoA, suppressed the hairy phenotype. **C.** In contrast, expression of dominant-active Cdc42 exaggerated the hairy phenotype by inducing the formation of longer and stronger actin spikes (three-dimensional reconstructions of stacks of confocal images). **D.** The same experiment performed with plasmids encoding Cdc42 effector-loop mutants revealed that signaling through WASP, and not through Rac1, accentuated the hairy phenotype. Results are normalized based on the control response (*significant difference versus control, $P < 0.01$). **E.** Cells transfected with either dominant-negative mutant or constitutively active Cdc42 became insensitive or refractory to IR4-a action. Scale bars, 4 μ m.

also led to hairy cell death (data not shown). In contrast, when dominant-active V14RhoA was expressed, a profound effect was observed with almost complete disappearance of actin spikes (Figure 2, A and B). Interestingly, this phenotype was indistinguishable from the one observed under Cdc42 inhibition (Figure 2A).

To gain further insights into Cdc42 signaling in hairy cells, similar experiments were performed with a second generation of Cdc42 mutants. Cdc42 is able to induce diverse cellular responses via WASP, the PAK family, or ACK effectors through a region named effector-loop.³⁴ We used previously characterized Cdc42 effector-loop mutants as tools to dissect the molecular pathways in-

involved in cytoplasmic protrusion induction. In a constitutively active background (provided by the L61 mutation), an additional mutation in this sequence restricts the interaction with some but not all effectors. Accordingly, the L61Cdc42F37A mutant retains its ability to activate WASP but is deficient for Rac1 activation, whereas the L61Cdc42Y40C still signals to Rac1 but is unable to stimulate WASP.³⁴ Transient transfection of GFP-L61Cdc42 accentuated the hairy phenotype similar to that of GFP-V12Cdc42 (Figure 2D). Cells expressing the GFP-L61Cdc42F37A mutant displayed a morphology not significantly different from those expressing GFP-L61Cdc42 (data not shown), indicating that signaling to

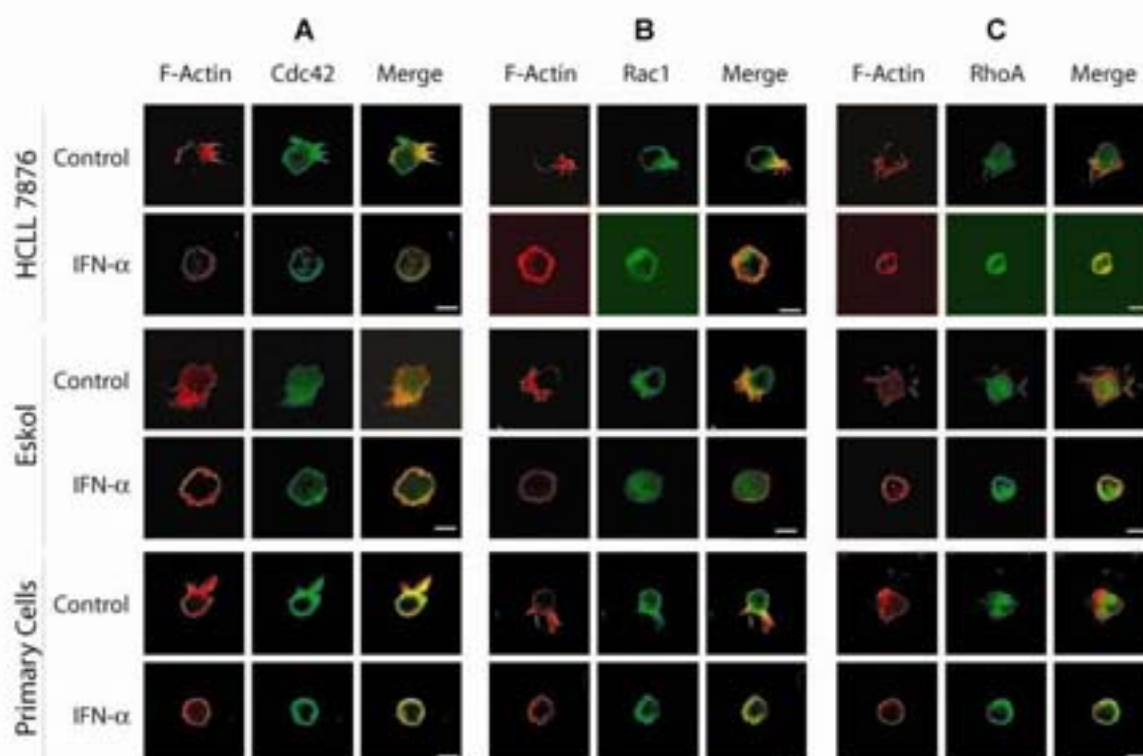


Figure 3. Immunolocalization of endogenous RhoGTPases in hairy cells and relocalization on IFN- α treatment. HCLL-7876, Eskol, or primary cells were either left untreated or treated with IFN- α for 18 hours. Cells were harvested, fixed, and stained for F-actin (rhodamine-phalloidin) and RhoGTPases (primary antibodies recognizing the RhoGTPases were revealed with FITC-labeled secondary antibody) and observed by confocal microscopy. RhoGTPases (green) co-localizing with F-actin (red) at the cell cortex or within cellular protrusions appeared in yellow (merge). IFN- α induced the relocalization of Cdc42 (A), Rac1 (B), and RhoA (C). Each image is a confocal section. Scale bar, 4 μ m.

WASP was sufficient to exacerbate the hairy phenotype. In accordance with these data, expression of the GFP-L61Cdc42Y40C mutant impaired in WASP signaling did not mimic the effect of GFP-L61Cdc42 (Figure 2D). These results are congruent with the observation that transfection of a constitutively active form of Rac1 did not alter the hairy cell appearance.

Because both IFN- α treatment and overexpression of N17Cdc42 reduced the hairy-like phenotype, we next asked whether altering Cdc42 activity would change cytoskeletal responsiveness to IFN- α treatment in these cells. Cells were transfected as above and were subsequently either left untreated or treated with IFN- α for 18 hours. Data presented in Figure 2E revealed that plasma membrane smoothing was obtained in all cells overexpressing N17Cdc42, and IFN- α did not alter this effect. Cells transfected with active Cdc42 were refractory to IFN- α action. These data suggest that IFN- α receptor signaling acts either upstream or at the level of Cdc42 to regulate cytoskeletal organization.

IFN- α Alters GTPase Activities in Hairy Cells

Analysis of RhoGTPase Localization by Immunofluorescence Experiments

The results described above revealed that RhoGTPases could be involved in the defective cytoskeletal or-

ganization of hairy cells and that GTPases are potential targets of IFN- α treatment. Whether IFN- α affects the expression and activation states of RhoGTPases was next investigated. Inactive GTPases (i.e. GDP-bound forms) reside in the cytoplasm, bound to the regulatory RhoGDI protein. On activation, RhoGDI is displaced and an aliphatic sequence is unmasked, allowing GTPases to anchor into membranes where they interact with effectors.³⁶ Consequently, active GTPases (GTP-bound) are found associated with membranes and this localization reflects their activation state. We therefore used immunofluorescence techniques to localize endogenous RhoGTPases in untreated hairy cells and explored the effects of IFN- α on their spatial distribution. Phalloidin staining revealed a thick ring of cortical polymerized actin underlying the contours of the plasma membrane and a loose network of F-actin inside the cell. Immunofluorescence studies performed with primary antibodies recognizing the RhoGTPases, followed by fluorescein isothiocyanate-labeled secondary antibody, were used to localize endogenous GTPases within the cells by confocal microscopy (Figure 3). Close association of GTPases with the plasma membrane was revealed by superposition of the two fluorochromes. In these experiments, Cdc42 was detected both at the plasma membrane (including that of villousities) and in the cytosol of both cell lines. When cells were treated with IFN- α , the reduction of membrane vil-

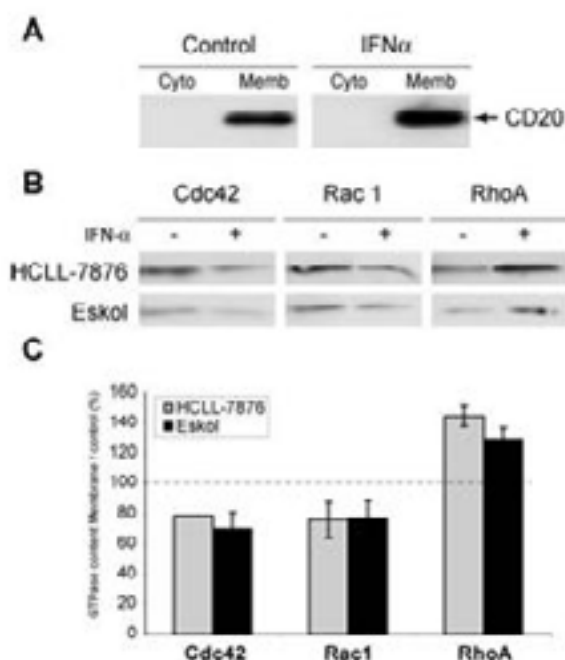


Figure 4. Distribution of RhoGTPases in cell fractionation experiments. HCLL-7876 and Eskol cells were either left untreated or treated with IFN- α for 18 hours. **A:** Proteins were fractionated into membrane and cytosolic fractions, and the CD20 protein was taken as a membrane marker. **B:** Equal amounts of membrane proteins were loaded on the gel and separated by electrophoresis followed by Western blotting using RhoGTPase-specific antibodies (one representative experiment). **C:** The amount of GTPases found in the membrane fraction was quantified in three experiments and is presented as percentage of the control response obtained in untreated cells. IFN- α induced a depletion of Cdc42 and Rac1 from the membrane fraction and the translocation of RhoA to the membrane fraction.

losities forced Cdc42 relocalization. However, most of Cdc42 remained at the cell periphery and did not translocate to the cytosol (Figure 3A). By contrast, Rac 1 was easily detected at the plasma membrane of Eskol cells and was found to redistribute, at least in part, into the cytosol after IFN- α treatment (Figure 3B). Finally, RhoA was mainly cytosolic in untreated hairy cells. IFN- α treatment resulted in a clear relocalization of RhoA at the cortical actin ring, beneath the plasma membrane in both cell lines (Figure 3C). Similar subcellular localization of Cdc42, Rac, and RhoA were seen in fresh primary hairy cells (PR) (Figure 3, A-C).

Analysis of RhoGTPase Localization Using Cell Fractionation Experiments

Membrane-bound GTPases were also detected by cell fractionation experiments combined with Western blot analysis. Membrane and cytosolic fractions were prepared with cells that had been either left untreated or treated with IFN- α and the amount of each RhoGTPase present in both fractions was determined by Western blot using specific antibodies. When cells were exposed to IFN- α , significant changes were observed in GTPase distribution. Cdc42 and Rac1 were found depleted from

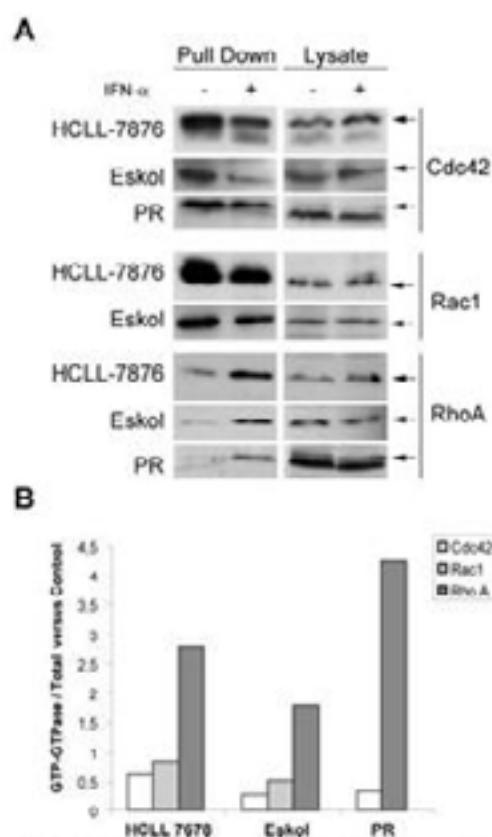


Figure 5. RhoGTPase activities analyzed by pull-down experiments. Hairy cells were either left untreated or incubated in the presence of IFN- α (18 hours). Cells were then lysed, and active GTPases were affinity precipitated with GST-FBD- ρ hotekin or GST-CRIB-PAK, eluted from the beads, and analyzed by Western blotting with the relevant antibodies. For each point, a fraction of the cell lysate harvested before precipitation was run to monitor GTPase content in each sample. **A:** IFN- α down-regulated Cdc42 and Rac1 activities and up-regulated that of RhoA in both cell lines as in primary cells. For each GTPase, quantification was made. The percentage of the GTPase under its GTP-bound form in the presence of IFN- α was divided by the one calculated in the absence of IFN- α . A graph showing these ratios is shown in **B.** IFN- α down-regulated Cdc42 and Rac1 activities and up-regulated that of RhoA.

plasma membranes whereas, in parallel, RhoA became more associated with these fractions (Figure 4).

Direct Analysis of RhoGTPase Activity by Selective Precipitation of GTP-Bound GTPases

To measure alterations in the ratio of GTP-bound versus GDP-bound GTPases, hairy cells were treated as before, cell lysates were made and subjected to the pull-down experiment.²⁵ GST fusion proteins containing GTPase-binding domains of effectors, CRIB of PAK for Rac and Cdc42²⁶ and ρ hotekin for RhoA,²⁷ were coupled to agarose beads to selectively precipitate GTP-bound GTPases from hairy cells. Western blot analysis of affinity-purified proteins revealed that prolonged IFN- α exposure induced a decrease in the GTP-Cdc42 content for both cell lines as well as for primary cells (Figure 5A). Similarly, under the same conditions, the amount of Rac1-GTP

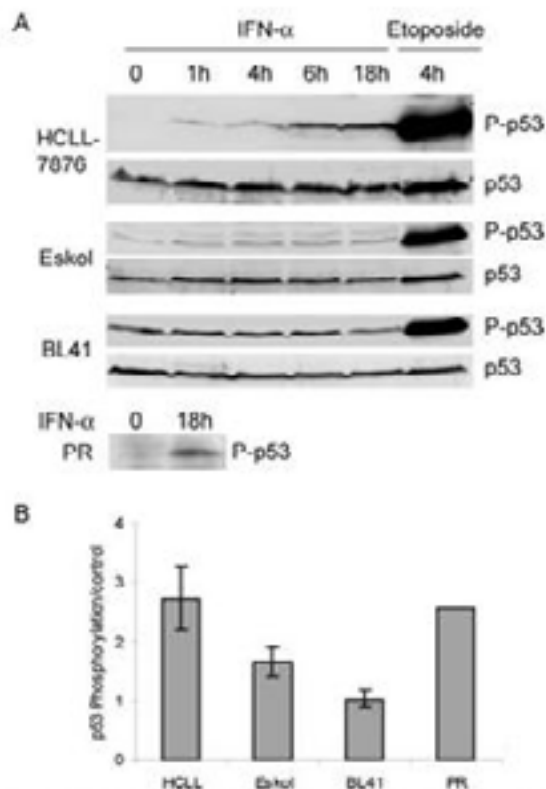


Figure 6. Alteration of p53 status by IFN- α in hairy cells. HCLL-7876, Eskol, primary hairy, or BL41 cells were either left untreated or treated with IFN- α for various periods of time and cell lysates were prepared. Equal amounts of proteins (200 μ g per lane) were loaded on gels and separated by SDS-PAGE. **A**, p53 phosphorylation and expression were assessed by Western blot using relevant antibodies (shown is one representative experiment, HCLL-7876, Eskol, and PR blots were exposed for 10 minutes for autoradiography, BL41 was exposed for 1 minute). **B**, The amount of phosphorylated p53 protein measured 18 hours after transfection was quantified in three independent experiments and is presented as fold increase of the basal response obtained in untreated cells. IFN- α consistently induced a time-dependent increase in p53 phosphorylation on S15 in hairy cells but not in the Burkitt lymphoma cell line.

precipitated was also reduced. RhoA, again, displayed a distinct pattern, with a rise in the RhoA-GTP content in response to IFN- α treatment. Highly similar results were obtained with primary hairy cells treated *in vitro* with IFN- α (PR cells). The IFN- α -induced changes in the GTPase-GTP/total GTPase ratios were calculated for each GTPase (Figure 5B).

IFN- α Affects p53 Status in Hairy Cells

Taken together, the results presented above suggested to us that the IFN- α effect was mediated at the level of Cdc42, affecting Cdc42 activity and membrane localization. The tumor suppressor p53 is functionally connected to the RhoGTPase network and p53 is now known to counteract Cdc42-induced filopodia formation.¹⁶ Interestingly, hairy cells are often affected in their p53 status.^{36,37} In Eskol and HCLL-7876 cell lines, p53 expression was barely detectable when compared to a Burkitt B-cell line (Figure 6A) (hairy cell blots were exposed to

autoradiography for much longer periods and gave fainter bands). Because IFN- α has been shown to induce the expression and activation of p53 in tumor cells,¹⁷ we hypothesized that induction/activation of p53 could be involved in the disappearance of hairy cell protrusions. The low expression of p53 in the two cell lines was not increased by IFN- α , but a marked stimulation was detected on treatment with the robust p53-inducer etoposide (Figure 6A). Thus, p53 expression is efficiently stabilized by etoposide but only weakly by IFN- α . However, p53 phosphorylation at S15 increased in a time-dependent manner in response to IFN- α in hairy cell lines. In these experiments, a p53-deficient and IFN- α -sensitive tumor cell line, not derived from HCL but from a Burkitt lymphoma, BL41 cells, were used as a control to examine the specificity of the response. p53 phosphorylation was not increased in BL41 cells (Figure 6A). Primary hairy cells also responded to IFN- α by increasing S15 phosphorylation (Figure 6A), and p53 protein expression was below the threshold of detection by Western blot. When up-regulated on etoposide treatment, p53 accumulated under a form phosphorylated at S15 in HCLL-7876, Eskol, and BL41 cells. To determine whether p53 could be involved in the cytoskeletal response, cells were transfected with a p53-GFP fusion protein. Ectopic expression of p53 (GFP-p53; Figure 7A) led to a complete disappearance of the cytoplasmic protrusions in all transfected cells. When analyzed by Western blot, the ectopic p53 protein was found phosphorylated at S15 (Figure 7B). To confirm the effects of IFN- α treatment on p53, a GFP-tagged version of a naturally occurring dominant-negative p53 mutant (p53R175H)³⁸ was transfected in hairy cells and the morphological changes induced on IFN- α were investigated. The cell membrane-smoothing effect of IFN- α was greatly reduced in cells expressing the dominant-negative p53 mutant (Figure 7C). These results indicate that p53 is integrated in the overall IFN- α response leading to the disappearance of actin spikes. Finally, activation of p53 by etoposide ablated cell protrusions and killed hairy cells in a dose-dependent manner within 18 hours of treatment (Figure 7D).

Discussion

Hairy cells display an irregular profile, with numerous membrane extensions such as thin microspikes made up of long bundles of F-actin and broader lamellipodia-like structures. Cdc42 has been shown to control the formation of filopodia as well as other types of protrusions.³⁹ The various kinds of actin configuration observed in hairy cells are similar to those obtained when active forms of Cdc42 and Rac1 are overexpressed.

RhoGTPase Activities Contribute to Hairy Cell Morphology

Experiments performed to inhibit Cdc42 activity using transient transfection protocols revealed that constitutive signaling through Cdc42, or a closely related GTPase

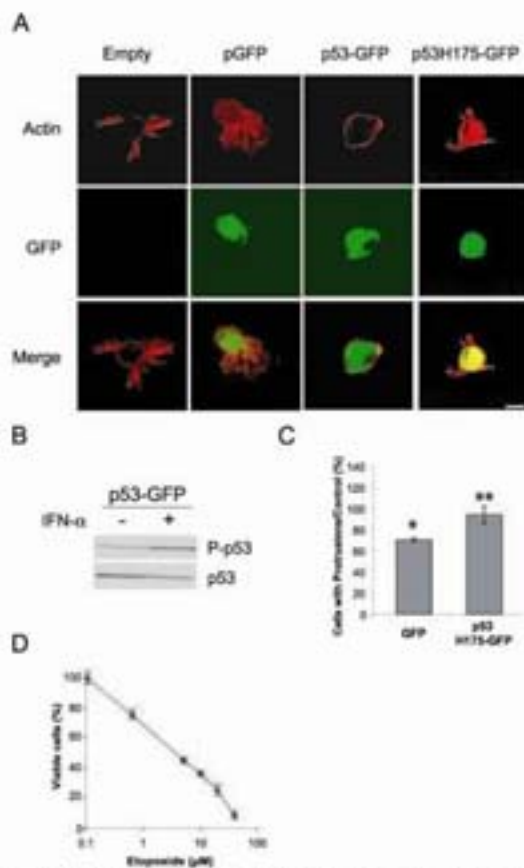


Figure 7. p53 regulates hairy cell morphology. HCLL-7876 cells were transfected with an empty vector or with a plasmid encoding GFP, GFP-p53, or GFP-p53H175. Twenty-four hours after transfection, cells were harvested, fixed, stained for F-actin with rhodamine-phalloidin, and observed by confocal microscopy. **A:** Expression of GFP-p53 led to a complete disappearance of cell protrusions in all transfected cells whereas expression of p53H175-GFP did not affect the phenotype. **B:** Western blot analysis of these cells revealed basal phosphorylation of the fusion protein GFP-p53 on S15, which was further increased by IFN- α . HCLL-7876 cells were transfected with plasmids encoding either GFP or the dominant-negative mutant of p53, GFP-p53H175. Cells were allowed to express the plasmids for 24 hours and then treated or not with IFN- α for 18 hours. Cells were harvested, fixed, stained for F-actin with rhodamine-phalloidin, observed by confocal microscopy, and analyzed as described in Figure 2. Expression of dominant-negative p53 prevented morphological changes in response to IFN- α . **C:** Results are normalized based on the control response (*significant difference versus control, $P < 0.05$). To evaluate the effects of the p53 activator etoposide on cell viability, HCLL-7876 cells were treated with increasing concentrations of etoposide to stimulate p53 activity. After 18 hours, cell viability was determined, and results are presented as percentage of viable cells. **D:** Etoposide killed hairy cells in a dose-dependent manner within 18 hours of treatment. Scale bar, 4 μ m.

also able to interact with WASP, contributes to the unusual phenotype of hairy cells: Cytoplasmic processes were lost or dramatically decreased by inhibition of either Cdc42 or WASP. This latter protein, by recruiting the actin polymerization machinery (Arp2/3 complex), allows filopodia extension. Although filopodia can also be formed in the absence of WASP,^{40,41} our results obtained with the WASP-CRIB mutant indicate that cytoplasmic protrusions of hairy cells are WASP-dependent. Overexpression of a constitutively active form of Cdc42 exaggerated the phenotype by promoting the formation of longer spikes,

strengthening our conclusions. Finally, expression of an active Cdc42 mutant that selectively stimulates WASP (L61Cdc42F37A) confirmed this result. Although the organization of the actin filament system is cell-type-dependent, other GTPases related to Cdc42 such as TC10, RhoD, RhoG, and Wrch1 can also stimulate the formation of membrane protrusions and some of them are known to interact with WASP.^{2,42} Future studies will explore the role of these other RhoGTPase members in HCL.⁴³

Expression of V12Rac in hairy cells did not significantly affect F-actin organization, suggesting that Rac was already activated. These findings are consistent with the high levels of Cdc42 activity found in these cells as Rac1 is positioned downstream of Cdc42 in signaling cascades controlling cytoskeletal remodeling.⁵ Inhibiting Rac1 also results in significant smoothing of the hairy cell phenotype, suggesting that the defect leading to aberrant cytoskeleton organization is located upstream of Rac1. One plausible explanation for the inhibitory effect observed on dominant-negative Rac1 expression could reside in the ability of this protein to bind GEF(s) also active on Cdc42 family members. Several attempts to inhibit Rho activity resulted in hairy cell death, suggesting that hairy cells cannot survive inhibition of Rho. In contrast, expression of a constitutively active form of RhoA resulted in a normalization of the cellular morphology. Overexpression of V14RhoA had the same effect on cell morphology changes of hairy cells as N17Cdc42 or N17Rac1. Whether IFN- α -induced activation of RhoA is responsible for Cdc42 and Rac1 inhibition remains to be determined.

IFN- α Regulates Cdc42, Rac1, and RhoA Activities

Hairy cells incubated in the presence of IFN- α lose their characteristic villousities. Expression of mutants able to inhibit Cdc42 or expression of an active RhoA mutant mimics the effects of IFN- α in suppressing cytoplasmic processes. The striking resemblance of the resulting phenotypes suggested to us that activating RhoA could result in Cdc42 inhibition. To address this point, subcellular immunolocalization, membrane fractionation, and pull-down experiments allowed us to compare the relative levels of active endogenous GTPases in IFN- α -treated versus control cells. Direct measurements of RhoGTPase activities using the pull-down method showed that Cdc42 and Rac1 activities were reduced on prolonged (18 hours) exposure to IFN- α , whereas that of RhoA was clearly increased. The three approaches converged on the same conclusions for Rac1 and RhoA. Pull-down experiments demonstrated a reduction in the total pool of Cdc42 activity and depletion of Cdc42 from membrane fractions after IFN- α treatment. However, although Cdc42 did redistribute when cytoplasmic protrusions were reduced, Cdc42 immunostaining remained co-localized with cortical actin at the cell periphery. A plausible explanation for these contrasting findings is that a Cdc42 membrane-targeting signal exists in hairy cells and remains in IFN- α -treated cells as indicated by the co-local-

ization of cortical actin and Cdc42 seen using the immunofluorescence approach. Pull-down experiments showed that Cdc42 cannot be activated in the presence of IFN- α or that GTP-bound Cdc42 is instantly hydrolyzed by a putative increase in GAP activity. The fact that hairy cells transfected with the GAP-deficient Cdc42 mutant were found refractory to IFN- α action supports this conclusion.

RhoGTPases Are Likely to Contribute to the Tumorigenesis of HCL

Cdc42 is a Ras-related protein that has been implicated in the control of normal cell growth and, when improperly regulated, in cellular transformation and invasiveness.⁴⁴ The presence of a transforming gene in hairy cells was documented by established methods,⁴⁵ but the oncogene involved has not been identified yet. Increased expression of cyclin D1 occurs in HCL.⁴⁶ Cyclin D1 is under the control of Rac1 to control cell-cycle progression, and high levels of active Rac1 could thereby contribute to tumorigenesis by disturbing the normal cell cycle. Hairy cells also exhibit abnormal constitutive expression of an AP1 complex containing junD.⁴⁷ Regulation of AP1 is dependent on Cdc42/Rac1 signaling, in agreement with our findings. Finally, inhibitory mutants of Cdc42 and Rac were shown to reduce cell growth in another hairy cell line.⁴⁸

Cdc42 is unlikely to be oncogenic by itself because its activity could be down-regulated by IFN- α as measured by pull-down experiments. Dominant-negative mutants exert their inhibitory effects by titrating GEF, and the inhibition of cytoplasmic protrusions observed with both N17Cdc42 and N17Rac suggest that a common GEF might be involved in this process as already proposed above. The oncogenic potential involving RhoGTPase in tumors is often driven by alterations in GEF or GAP activities.^{43,49} Future studies will explore the expression and regulation of these proteins in hairy cells.

Interestingly, a previous report from Zhang and colleagues⁴⁸ compared RhoGTPase expression and status in leukemic cells from HCL, B-cell lymphocytic leukemia, and B-cell acute leukemia and concluded that RhoGTPases are uniquely activated in HCL. However, in this study RhoA was found constitutively activated when compared to its status in non-HCL leukemic cells. In the present study we compared RhoA activity in the presence and absence of IFN- α . We did not assess the basal activation status of RhoA but demonstrate that RhoA activity is further increased by IFN- α . In the same study, it was reported that only dominant-negative Rac could reduce cell protrusions. However, the approach used by Zhang and colleagues⁴⁸ differs from ours in that dominant-negative mutants were expressed in stable cell lines whereas we used transient transfection protocols. More importantly, the BNBH-1 hairy cell line used in their study has been derived from a Japanese hairy cell variant type of HCL, which differs in many respects from typical HCL seen in western countries and from which HCLL-7876 and Eskol cells have been derived. The predominant role

of Cdc42 in hairy cells could be another distinctive feature of typical HCL, not occurring in Japanese HCL disease.

Our data show that IFN- α increases RhoA activity. These findings are in agreement with those reported by Badr and colleagues²³ in mature normal B cells. This study reported a regulatory effect of IFN- α on RhoA in the context of ligand-induced chemokine receptor internalization in normal B cells.²³ The regulation of RhoA in B cells seems different from that described for fibroblasts and macrophages.^{23,50} In adherent cells, activation of RhoA has often been linked with tumorigenicity, but recent work suggests that RhoA can also induce cell cycle arrest via its effector ROCK.⁵¹ In addition, prolonged inhibition of RhoA in lymphocytes *in vivo* has been shown to induce development of lymphoma,⁵² suggesting that elevating levels of RhoA may antagonize a positive signal for proliferation/tumorigenesis.

IFN- α Regulation of RhoGTPase Activities and Increased Activation of p53 May Have Anti-Tumoral Benefit

Tumor expansion often results from the accumulation of cancer cells that are unable to apoptose. In HCL patients in which IFN- α therapy is successful, hairy cells are rapidly cleared from the blood, suggesting the occurrence of tumor cell apoptosis.⁵³ Extensive *in vitro* studies have established that IFN- α is not a direct inducer of programmed cell death for hairy cells but restores their sensitivity to apoptosis-inducing agents.⁵³ Interestingly, cells expressing active Rac1 have been demonstrated to be resistant to apoptotic inducers of various origins.^{12,14} It is tempting to speculate that the high levels of active Rac1 found in hairy cells prevent effective killing by the immune system. We previously reported that hairy cells exhibit high levels of intracytoplasmic calcium $[Ca^{2+}]_i$,³¹ a phenomenon that could also protect hairy cells from programmed cell death. $[Ca^{2+}]_i$ was found reduced on IFN- α treatment.⁵⁴ Because Rac1 has recently been shown to increase $[Ca^{2+}]_i$,⁵⁵ the observed reduction in Rac1 activity could be involved in the normalization of $[Ca^{2+}]_i$. Tumor cells are prone to apoptose, but high $[Ca^{2+}]_i$ ³¹ or active Rac1 (this study) could protect hairy cells from programmed cell death. By decreasing Rac1 activity, IFN- α could down-regulate certain cellular processes to a threshold where cells become responsive to apoptosis inducers.

As stated above, the genetic mechanisms underlying the pathogenesis of HCL are unknown, although the tumor suppressor p53 is frequently deleted or mutated compared to other hematological malignancies.³⁰ In normal cells, Rac1 and Cdc42 extinction activates endogenous p53, and apoptosis induction in response to inhibition of Rac1 and Cdc42 requires p53.¹⁶ In addition, p53 exerts a selective effect on Cdc42-mediated cell functions.¹⁶ In p53-null mice, either overexpression of wild-type p53 or activation of endogenous p53 counteracts Cdc42-induced filopodia formation. Mechanistic studies indicate that p53 prevents the initiating steps of filopodia

formation operating at the level of Cdc42 itself or immediately downstream of it.¹⁶ In our models of hairy cells, p53 expression was low, suggesting mono-allelic deletion and/or protein instability. In these cells, overexpression of wild-type p53 or activation of endogenous p53 reduces cell protrusions, indicating that a similar mechanism could be involved. The p53 activator etoposide completely ablated cell protrusions and killed hairy cells in a dose-dependent manner.

Although the consequences of IFN- α -induced cytoskeletal reorganization on hairy cell behavior remains an open question, alterations of RhoGTPase status in hairy cells are likely to correlate with their distinctive profile of integrin receptors, activation status, and invasive behavior of the bone marrow and spleen.^{20,56,57} The normalization of RhoGTPase activities and the increased activation of p53 may have therapeutic anti-tumoral benefits by reducing tumor expansion, invasiveness, and/or increasing apoptosis. Our data illustrate the link between p53 and the cytoskeleton in a pathological situation in which p53 regulates RhoGTPase-dependent cell effects that control actin cytoskeletal dynamics. This novel function of p53 may contribute to anti-tumor activity.

Acknowledgments

We thank Dr. J.P. Vial and Pr. J.F. Viillard (Haut-Levêque Hospital, Pessac, France) for phenotyping the cell lines and providing primary hairy cell samples; Dr. J. Bertoglio (INSERM-U461, Chatenay-Malabry, France) for providing the Tat-C3; Dr. J. Collard (The Netherlands Cancer Institute, Amsterdam, The Netherlands) for GST-fusion proteins; Dr. A. Hall and Dr. S. Etienne-Manneville (University College of London, London, UK) for dominant-negative WASP; Dr. F. Ichas (IECB/INSERM, Pessac, France) for the gift of etoposide; Dr. T. Taniguchi and Dr. A. Takaoka (University of Tokyo, Tokyo, Japan) for helpful discussions; Dr. P. Fort for GFP-GTPase fusion proteins encoding plasmids; and Dr. P. Roux (CRBM CNRS-UPR-1086) for GFP-p53 fusion proteins encoding plasmids and critical reading of the manuscript.

References

- Bouroncle BA: Leukemic reticuloendotheliosis (hairy cell leukemia). *Blood* 1979, 53:412-436
- Aspenstrom P, Fransson A, Saras J: Rho GTPases have diverse effects on the organization of the actin filament system. *Biochem J* 2004, 377:327-337
- Van Aelst L, D'Souza-Schorey C: Rho GTPases and signaling networks. *Genes Dev* 1997, 11:2295-2322
- Aspenstrom P: Effectors for the Rho GTPases. *Curr Opin Cell Biol* 1999, 11:95-102
- Nobes CD, Hall A: Rho, rac, and cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia. *Cell* 1995, 81:53-62
- Woodside DG, Wooten DK, Teague TK, Miyamoto YJ, Caudell EG, Udagawa T, Andrus BF, Mohiyre BW: Control of T lymphocyte morphology by the GTPase Rho. *BMC Cell Biol* (serial online) 2003, 4:2
- Bird MM, Lopez-Lluch G, Ridley AJ, Segal AW: Effects of microinjected small GTPases on the actin cytoskeleton of human neutrophils. *J Anat* 2003, 203:379-389
- Blanchard JM: Small GTPases, adhesion, cell cycle control and proliferation. *Pathol Biol (Paris)* 2000, 48:318-327
- Olson MF, Paterson HF, Marshall CJ: Signals from Ras and Rho GTPases interact to regulate expression of p21Waf1/Cip1. *Nature* 1996, 384:295-299
- Hill CS, Wynne J, Treisman R: The Rho family GTPases RhoA, Rac1, and CDC42Hs regulate transcriptional activation by SRF. *Cell* 1995, 81:1159-1170
- Sotropoulos A, Ginetis D, Copeland J, Treisman R: Signal-regulated activation of serum response factor is mediated by changes in actin dynamics. *Cell* 1999, 90:159-169
- Zhang B, Zhang Y, Shacter E: Rac1 inhibits apoptosis in human lymphoma cells by stimulating Bad phosphorylation on Ser-75. *Mol Cell Biol* 2004, 24:6205-6214
- Genot EM, Arriquerlou C, Ku G, Burgering BM, Weiss A, Kramer IM: The T-cell receptor regulates Akt (protein kinase B) via a pathway involving Rac1 and phosphatidylinositol 3-kinase. *Mol Cell Biol* 2000, 20:5469-5478
- Murga C, Zohar M, Teramoto H, Gutkind JS: Rac1 and RhoG promote cell survival by the activation of PI3K and Akt, independently of their ability to stimulate JNK and NF- κ B. *Oncogene* 2002, 21:207-216
- Lassus P, Roux P, Zugasti O, Phillips A, Fort P, Hübner U: Extinction of rac1 and Cdc42Hs signalling defines a novel p53-dependent apoptotic pathway. *Oncogene* 2000, 19:2377-2385
- Gadea G, Lapasset L, Gauthier-Rouviere C, Roux P: Regulation of Cdc42-mediated morphological effects: a novel function for p53. *EMBO J* 2002, 21:2373-2382
- Takaoka A, Hayakawa S, Yanai H, Stoiber D, Nagishi H, Kikuchi H, Sasaki S, Imai K, Shibue T, Honda K, Taniguchi T: Integration of interferon- α /beta signalling to p53 responses in tumour suppression and antiviral defence. *Nature* 2003, 424:516-523
- Welsh CF, Roovers K, Villanueva J, Liu Y, Schwartz MA, Assoian RK: Timing of cyclin D1 expression within G1 phase is controlled by Rho. *Nat Cell Biol* 2001, 3:950-957
- Kanowitz-Klein S, Saxon A, Uittenbogaart CH: Constitutive production of B cell differentiation factor-like activity by human T and B cell lines. *Eur J Immunol* 1987, 17:593-598
- Harvey W, Sour EF, Turner R, Carey R, Meze R, Starrett B, Kanagala R, Pereira D, Merchant P, Taylor M, Jansen J: Characterization of a new cell line (ESKOL) resembling hairy-cell leukemia: a model for oncogene regulation and late B-cell differentiation. *Leuk Res* 1991, 15:733-744
- Genot EM, Meier KE, Llocciardi KA, Ahn NG, Uittenbogaart CH, Witzterbin J, Clark EA, Valentine MA: Phosphorylation of CD20 in cells from a hairy cell leukemia cell line: Evidence for involvement of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II. *J Immunol* 1993, 151:71-82
- Genot E, Mathiot C, Kolb JP: Modulation of the response to B-cell growth factor (BCGF) of hairy cells from a patient under IFN- α therapy. *Blut* 1987, 55:65-67
- Badri G, Bohis G, Treton D, Richard Y: IFN(α) enhances human B-cell chemotaxis by modulating ligand-induced chemokine receptor signaling and internalization. *Int Immunol* 2005, 17:459-467
- Moreau V, Tatin F, Vaton C, Genot E: Actin can reorganize into podosomes in aortic endothelial cells, a process controlled by Cdc42 and RhoA. *Mol Cell Biol* 2003, 23:6809-6822
- Frankel B, Akkerman JW, Bos JL: Rapid Ca²⁺-mediated activation of Rap1 in human platelets. *EMBO J* 1997, 16:252-259
- Sander EE, Collard JG: Rho-like GTPases: their role in epithelial cell-cell adhesion and invasion. *Eur J Cancer* 1999, 35:1302-1308
- Castellano F, Montbourrier P, Guillemot JC, Gouin E, Machesky L, Cosart P, Chavrier P: Inducible recruitment of Cdc42 or WASP to a cell-surface receptor triggers actin polymerization and filopodium formation. *Curr Biol* 1999, 9:351-360
- Garniel H, Hiraoka A, Golomb HM: The effect of cultivation and interferon treatment on the surface morphology of hairy cell leukemia cells. *Cancer Invest* 1987, 5:389-399
- Miyoshi EK, Stewart PL, Kincade PW, Lee MB, Thompson AA, Wall R: Aberrant expression and localization of the cytoskeleton-binding p52 (LSP1) protein in hairy cell leukemia. *Leuk Res* 2001, 25:57-67
- Genot E, Valentine MA, Degos L, Sigaux F, Kolb JP: Hyperphospho-

- nylation of Cdc42 in hairy cells. Alteration by low molecular weight B cell growth factor and IFN- α . *J Immunol* 1991, 146:870-878
31. Genot E, Bismuth G, Degas I, Sigaux F, Wietzerbin J: Interferon- α downregulates the abnormal intracytoplasmic free calcium concentration of tumor cells in hairy cell leukemia. *Blood* 1992, 80:2060-2065
 32. Leung T, Chen XQ, Tan I, Manser E, Lim L: Myotonic dystrophy kinase-related Cdc42-binding kinase acts as a Cdc42 effector in promoting cytoskeletal reorganization. *Mol Cell Biol* 1998, 18:130-140
 33. Paterson HF, Self AJ, Garrett MD, Just I, Aktories K, Hall A: Microinjection of recombinant p21rho induces rapid changes in cell morphology. *J Cell Biol* 1990, 111:1001-1007
 34. Lamarche N, Tapon N, Stowers L, Burbelo PD, Aspenstrom P, Bridges T, Chant J, Hall A: Rac and Cdc42 induce actin polymerization and G1 cell cycle progression independently of p53PAK and the JNK/SAPK MAP kinase cascade. *Cell* 1996, 87:519-529
 35. Del Pozo MA, Kiesses WB, Alderson NB, Meller N, Hahn KM, Schwartz MA: Integrins regulate GTP-Rac localized effector interactions through dissociation of Rho-GDI. *Nat Cell Biol* 2002, 4:232-239
 36. Konig EA, Kussler WC, Day C, Porzolt F, Glickman BW, Messer G, Schmid M, de Chatel R, Marczak ZL, Demeter J: p53 mutations in hairy cell leukemia. *Leukemia* 2000, 14:706-711
 37. Valtanatos K, Brito-Babapulle V, Matuses E, Atkinson S, Catovsky D: p53 gene deletion and trisomy 12 in hairy cell leukemia and its variant. *Leuk Res* 1999, 23:1041-1045
 38. Ory K, Legros Y, Auguin C, Soussi T: Analysis of the most representative tumour-derived p53 mutants reveals that changes in protein conformation are not correlated with loss of transactivation or inhibition of cell proliferation. *EMBO J* 1994, 13:3496-3504
 39. Adams JC, Schwartz MA: Stimulation of fascin spikes by thrombospondin-1 is mediated by the GTPases Rac and Cdc42. *J Cell Biol* 2000, 150:807-822
 40. Snapper SB, Takeshima F, Anton I, Liu CH, Thomas SM, Nguyen D, Dudley D, Fraser H, Purlich D, Lopez-Iglesias M, Klein C, Davidson L, Bronson R, Mulligan RC, Southwick F, Geha R, Goldberg MB, Rosen PS, Harbige JH, Alt FW: N-WASP deficiency reveals distinct pathways for cell surface projections and microbial actin-based motility. *Nat Cell Biol* 2001, 3:897-904
 41. Pellegrin S, Mellor H: The Rho family GTPase Rlf induces filopodia through mDia2. *Curr Biol* 2005, 15:120-133
 42. Aarheim A, Broder YC, Cohen A, Fritsch A, Baliste B, Abo A: Chp, a homologue of the GTPase Cdc42Hs, activates the JNK pathway and is implicated in reorganizing the actin cytoskeleton. *Curr Biol* 1998, 8:1125-1128
 43. Karnoub AE, Symons M, Campbell SL, Der CJ: Molecular basis for Rho GTPase signaling specificity. *Breast Cancer Res Treat* 2004, 84:61-71
 44. Keely PJ, Westwick JK, Whitehead IP, Der CJ, Parise LV: Cdc42 and Rac1 induce integrin-mediated cell motility and invasiveness through PI3K. *Nature* 1997, 390:632-636
 45. Lane MA, Saiten A, Cooper GM: Stage-specific transforming genes of human and mouse B- and T-lymphocyte neoplasms. *Cell* 1992, 28:873-880
 46. Bosch F, Jares P, Campo E, Lopez-Guillermo A, Pons MA, Villamor N, Tassies D, Jaffe ES, Montserrat E, Rozman C, Cardesa A: PRAD-1/cyclin D1 gene overexpression in chronic lymphoproliferative disorders: a highly specific marker of mantle cell lymphoma. *Blood* 1994, 84:2726-2732
 47. Neolaou F, Teodoridis JM, Park H, Georgakis A, Farokhzad OG, Bottinger EP, Da Silva N, Rousselot P, Chomienne C, Fesenczi K, Anagnostou MA, Shelley GS: CD11c gene expression in hairy cell leukemia is dependent upon activation of the proto-oncogenes ras and junD. *Blood* 2003, 101:4039-4041
 48. Zhang X, Machii T, Matsumura I, Ezoe S, Kawasaki A, Tanaka H, Ueda S, Sugahara H, Shibayama H, Mizuki M, Kanakura Y: Constitutively activated Rho guanine triphosphatases regulate the growth and morphology of hairy cell leukemia cells. *Int J Hematol* 2003, 77:263-273
 49. Boettner B, Van Aelst L: The role of Rho GTPases in disease development. *Gene* 2002, 299:155-174
 50. Sacl A, Carpenter CL: RhoA GTPase regulates B cell receptor signaling. *Mol Cell* 2005, 17:205-214
 51. Brownick NA, Ghiassi M, Aakre M, Brown K, Singh V, Moses HL: TGF-beta-induced RhoA and p160ROCK activation is involved in the inhibition of Cdc25A with resultant cell-cycle arrest. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003, 100:15548-15553
 52. Cleavelley S, Henning S, Cantrell D: Inhibition of Rho at different stages of thymocyte development gives different perspectives on Rho function. *Curr Biol* 1999, 9:657-660
 53. Baker PK, Pettit AR, Slupsky JR, Chen HJ, Glenn MA, Zuzel M, Cawley JC: Response of hairy cells to IFN- α involves induction of apoptosis through autocrine TNF- α and protection by adhesion. *Blood* 2002, 100:647-653
 54. Yano S, Tokumitsu H, Soderling TR: Calcium promotes cell survival through CaM-K kinase activation of the protein-kinase-B pathway. *Nature* 1998, 395:684-687
 55. Price LS, Langeslag M, ten Klooper JP, Hordijk PL, Jainik K, Collard JG: Calcium signaling regulates translocation and activation of Rac. *J Biol Chem* 2003, 278:39413-39421
 56. Sahai E, Marshall CJ: RHO-GTPases and cancer. *Nat Rev Cancer* 2002, 2:133-142
 57. Burthem J, Cawley JC: Specific tissue invasion, localisation and matrix modification in hairy-cell leukemia. *Leuk Lymphoma* 1994, 14(Suppl 1):19-22

Chapitre 3

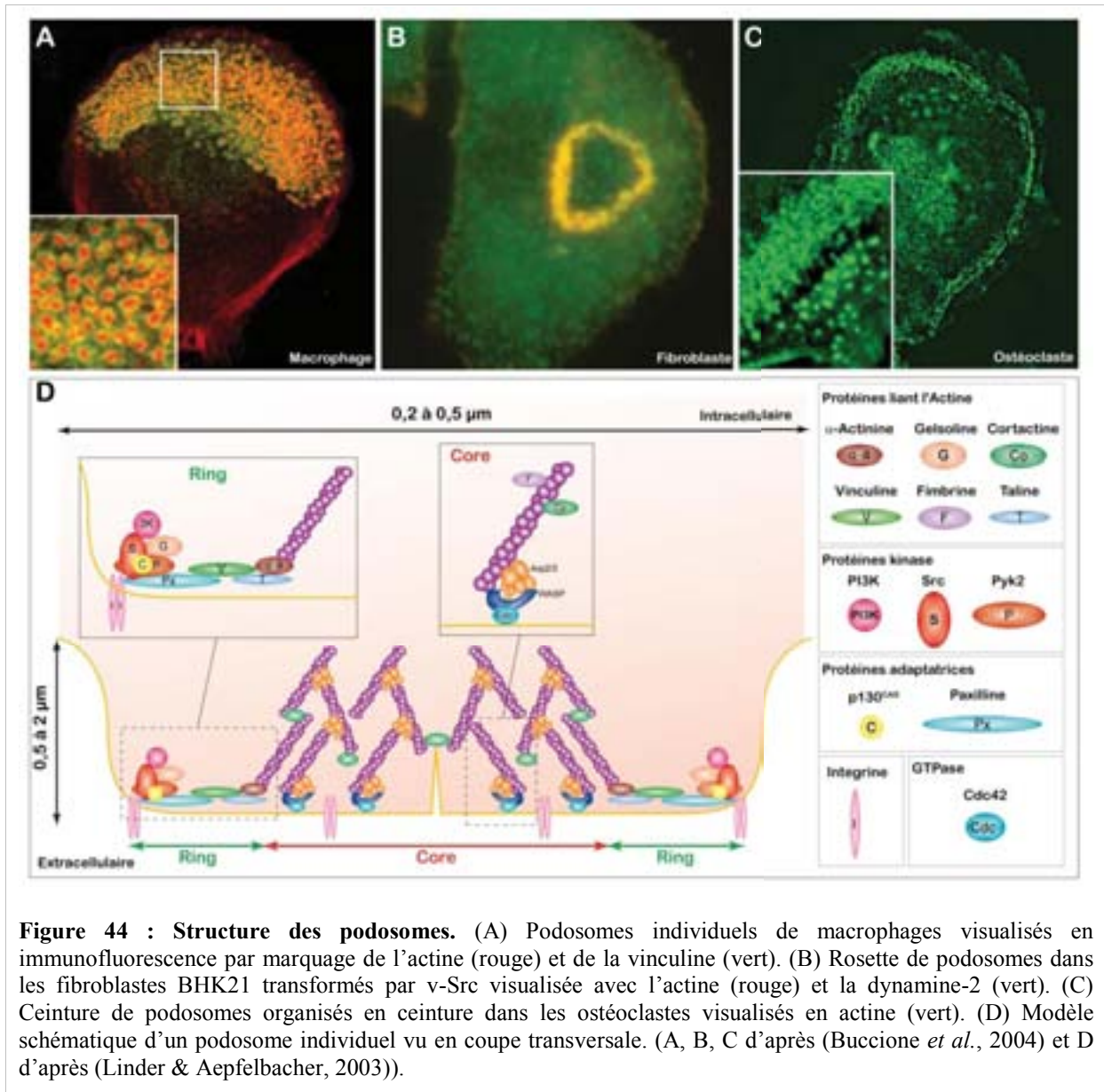
L'étude des podosomes *in vivo*

Section I : Introduction

Comme les adhérences focales, les podosomes sont des structures membranaires d'adhérence complexes, localisées à la face ventrale des cellules (Tarone *et al.*, 1985). Comme les filopodes, les lamellipodes et les « ruffles », ces structures sont associées à une organisation du cytosquelette d'actine (David-Pfeuty & Singer, 1980). Les podosomes ont été mis en évidence pour la première fois il y a plus de 25 ans, dans des fibroblastes transformés par le virus du Sarcome de Rous (David-Pfeuty & Singer, 1980; Tarone *et al.*, 1985), puis dans les tricholeucocytes (Caligaris-Cappio *et al.*, 1986) et dans diverses cellules malignes à haut pouvoir métastatique, comme les mélanomes ou les carcinomes mammaires (Seals *et al.*, 2005 ; Nakahara *et al.*, 1997). Entre temps, ils ont été découverts dans les cellules normales (non tumorales ou transformées), essentiellement dans des cellules d'origine hématopoïétique tels que, les monocytes/macrophages (Lehto *et al.*, 1982; Linder *et al.*, 2000; Linder *et al.*, 1999), les cellules dendritiques immatures (Burns *et al.*, 2001), les ostéoclastes (Marchisio *et al.*, 1984 ; Saltel *et al.*, 2004), les éosinophiles (Johansson *et al.*, 2004), les mastocytes (Suzuki *et al.*, 1998) et les cellules NK (Allavena *et al.*, 1991). Ils ont aussi été observés dans les cellules non hématopoïétiques tels que les cellules musculaires lisses (Hai *et al.*, 2002; Gimona *et al.*, 2003) et les cellules endothéliales (Moreau *et al.*, 2003; Varon *et al.*, 2006; Tatin *et al.*, 2006; Osiak *et al.*, 2005). Une structure apparentée au podosome a été décrite dans les cellules épithéliales (Spinardi *et al.*, 2004).

Au niveau structural, un podosome est constitué d'un cœur d'actine, le « Core », entouré par un anneau enrichi en intégrines et protéines associées (vinculine), le « Ring », l'ensemble étant localisé à la face ventrale des cellules (Linder & Aepfelbacher, 2003). On distingue plusieurs catégories de podosomes, en fonction de l'origine des cellules qui les portent (« invadopodes » dans les cellules métastatiques) ou de leurs arrangements dans la cellule (podosomes individuels ou plus ou moins fusionnés en anneau ou croissant (rosettes) ou en ceinture). Une des différences fondamentales, entre les podosomes et les adhérences focales, est que leur formation ne nécessite pas de synthèse protéique (Moreau *et al.*, 2003; Tarone *et al.*, 1985). Une autre différence provient des protéines associées aux podosomes. En effet, si beaucoup de molécules sont présentes dans les 2 structures (intégrines, PI3K, Src, vinculine,...), certaines sont spécifiques des podosomes comme la cortactine, les protéines WASP/N-WASP, la gelsoline, le complexe Arp2/3, la dynamine 2, les MMPs (Matrix Metalloproteases) ou la GTPase Cdc42 (Buccione *et al.*, 2004; Linder & Aepfelbacher, 2003) (*Figure 44*). La présence de cette dernière famille de protéines, laisse supposer un rôle des podosomes dans la dégradation de la matrice extracellulaire et la migration, que ce soit dans

des processus physiologiques tels que la migration transtissulaire des cellules immunitaires ou dans des processus pathologiques tels que les propriétés invasives des cellules malignes. Cependant, à ce jour aucune fonction n'est encore formellement démontrée.



Nous avons évoqué précédemment, l'implication des Rho GTPases, RhoA et Cdc42 dans la formation des podosomes dans la plupart des modèles étudiés (page 20). Les travaux antérieurs du laboratoire ont montré l'existence des podosomes dans les cellules endothéliales exprimant une forme constitutivement active de Cdc42 (Moreau *et al.*, 2003)}, traitées par les esters de phorbol (Tatin *et al.*, 2006) mais aussi en réponse à une cytokine, le TGFβ (Transforming Growth Factor) (Varon *et al.*, 2006).

Malgré le nombre important de cellules capables de former des podosomes, à ce jour aucune donnée expérimentale n'a été apportée permettant d'établir leur existence *in vivo*.

Dans la continuité des travaux menés par Violaine MOREAU, Florence TATIN et Christine VARON sur l'existence, la formation des podosomes dans les cellules endothéliales, nous avons donc décidé de mettre en œuvre une étude *in vivo*, afin de démontrer leur existence dans un contexte physiopathologique et aussi d'appréhender le rôle des podosomes des cellules endothéliales dans ces contextes. Nous avons choisi de mener cette étude sur l'endothélium de carotide de souris car ce vaisseau de gros calibre est accessible à la manipulation. Ce chapitre résume la mise au point technique de 2 modèles, un modèle type « chambre d'incubation » et un modèle de type « lésion » ainsi que les premiers résultats obtenus avec ce type d'approche, dans la démarche de mise en évidence des podosomes *in vivo*. Ce travail est le fruit de la collaboration avec le plateau technique de chirurgie de l'IECB en la personne de Viviane TRIDON.

Section II : Matériel et méthodes

I - Modèles d'étude

1 - Les animaux

Les animaux utilisés, sont des souris NMRI (Naval Medical Research Institute), de sexe féminin âgées de 6 à 13 semaines. Pour l'intervention les souris sont anesthésiées avec une solution de rompun® 2%, imalgène® 1000.

Pour les expériences nécessitant des injections systémiques de SB431542 (inhibiteur de la signalisation du TGF β), celles-ci sont réalisées dans la veine saphène, située sur la face interne de la cuisse.

2 - Le modèle « chambre d'incubation », la double ligature

Le modèle de double ligature est un modèle dans lequel nous créons une « chambre d'incubation » en ligaturant les 2 extrémités de la carotide droite. Après insertion d'un cathéter dans cette « chambre », les différentes substances à tester sont perfusées et incubées pendant les temps désirés. A l'issue de l'incubation les cellules sont fixées *in situ* par perfusion avec une solution de PFA 3% (paraformaldéhyde) après injection intracardiaque, pendant 10 minutes. Le segment de carotide est ensuite prélevé, et incubé pendant 10 minutes supplémentaires dans un bain de PFA 3% (Figure 45).

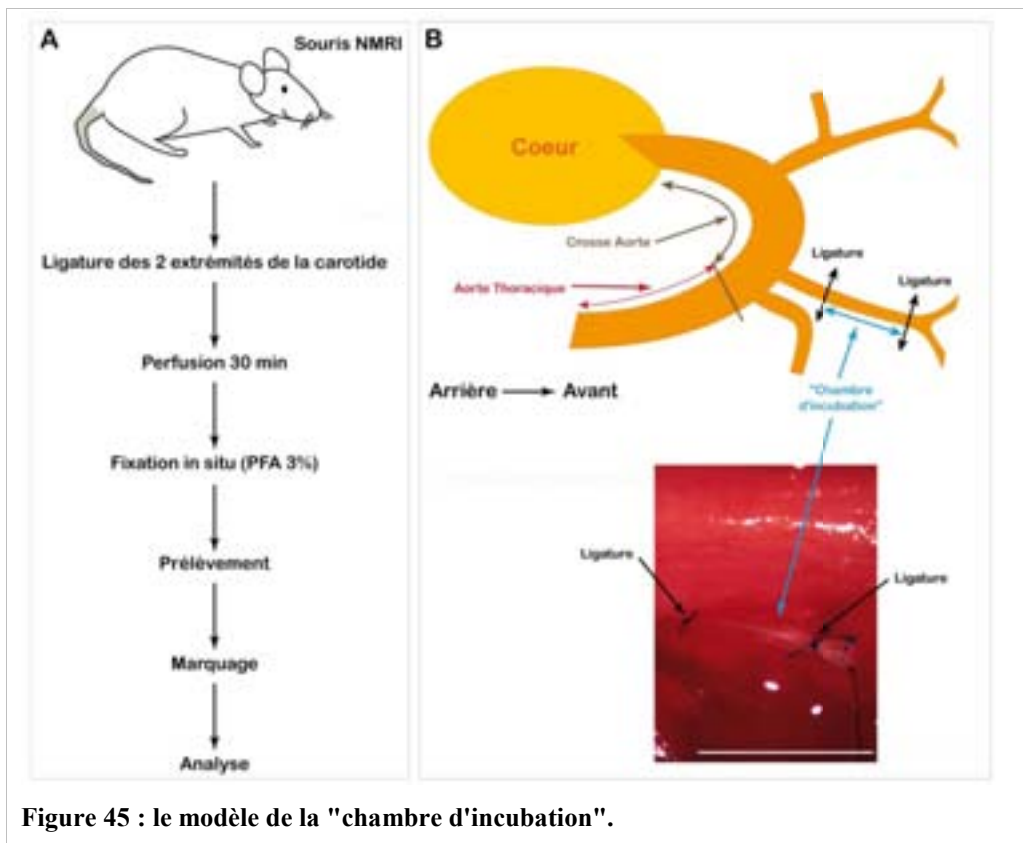


Figure 45 : le modèle de la "chambre d'incubation".

3 - Le modèle de « Lésion », la simple ligature

Dans le modèle de « lésion », nous ligaturons la carotide droite en son milieu, générant une zone de perturbation du flux sanguin en amont et une zone d'ischémie en aval de la ligature. La ligature est laissée en place pendant une période de 24h ou 48h, à l'issue de laquelle les cellules sont fixées par injection intracardiaque et perfusion avec une solution de PFA 3% pendant 10 minutes. Les segments de carotides (ischémique en aval et « reflux » en amont) sont ensuite prélevés et incubés pendant 10 minutes supplémentaires dans un bain de PFA 3. La *Figure 46* présente schématiquement ce modèle.

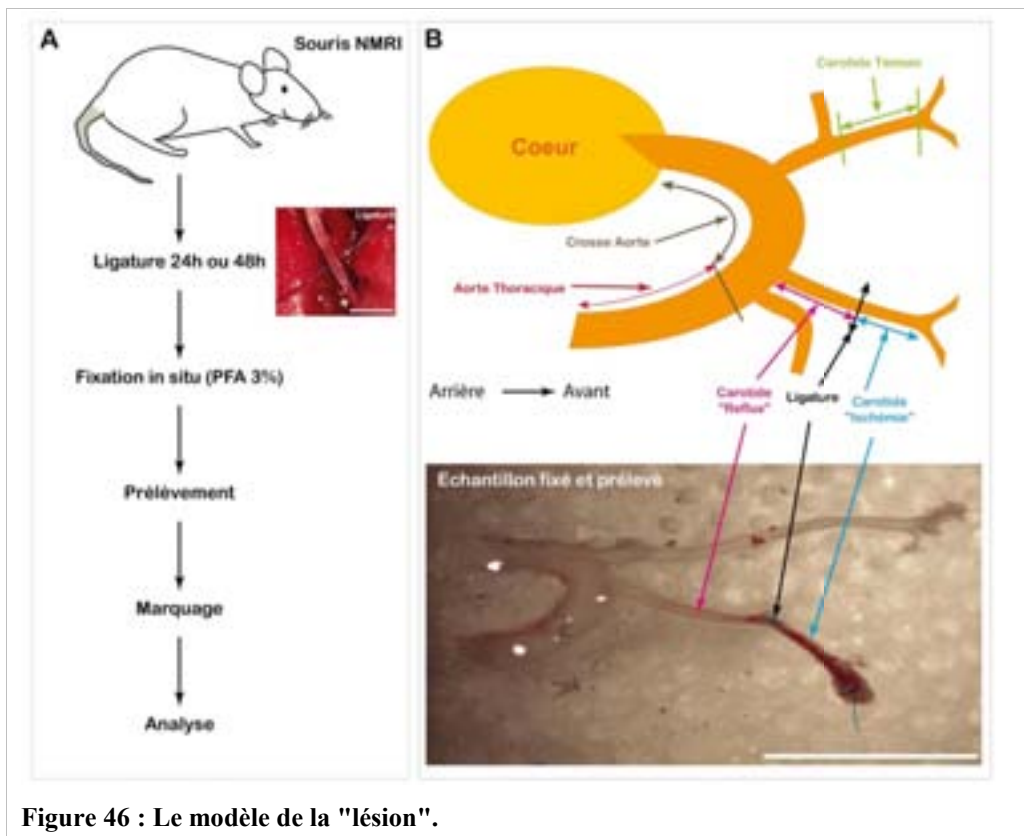


Figure 46 : Le modèle de la "lésion".

II - Acquisition des données

A - Marquage : protocole spécifique

Pour les marquages en immunofluorescence les échantillons prélevés et fixés sont lavés 3 fois 5 minutes avec une solution CB (Cystoskeletal Buffer ; ...), puis perméabilisés pendant 5 min avec une solution de triton X100 0,2%. Après 3 lavages supplémentaires en TBS les échantillons sont mis à saturer dans une solution de blocage (SVF %, BSA%) pendant 30 minutes. Les différents anticorps primaires sont dilués dans la solution de blocage et incubés pendant 1h sous agitation. Après 4 lavages de 5 minutes en TBS, les anticorps secondaires couplés aux fluorophores ainsi que la phalloïdine-alexa 635 et le hoechst 333342 sont incubés pendant 1h, à l'obscurité, sous agitation. Enfin, après 4 lavages de 5 minutes en TBS les échantillons sont montés entre lames et lamelles dans le milieu de montage (fluoromont[®]).

B - Lecture et analyse

Les lames sont analysées en microscopie confocale, sur un système ZEISS LSM510 basé sur un microscope inversé de type axiovert 200M. Les images sont acquises via le programme propriétaire de ZEISS en utilisant un objectif Plan-Apochromat" 63x (NA : 1,40) Oil DIC M27 (dt=0,19mm). Les différents anticorps secondaires fluorescents utilisés sont couplés soit à l'Alaxa-488, soit à l'Alexa-546. En complément, l'Actine est marquée par la

Phalloïdine-635 et l'ADN par le Hoechst 33342. Les images quatre couleurs sont obtenus après excitation par les lasers de longueurs d'onde, 405 nm (bleu, hoechst), 488 nm (vert, alexa-488), 546 nm (orange, alexa-546) et 635 nm (rouge, alexa-635). Le retraitement des images a été effectuée à l'aide du logiciel propriétaire de ZEISS et de Photoshop® CS (Adobe).

Section III : Résultats

I - Le marquage des cellules *in vivo* est différent du marquage *in vitro*

Tout d'abord au niveau expérimental, il est important de préciser que les préparations de carotides obtenues après marquage, présentent une très forte auto fluorescence sur l'ensemble du spectre (due à la lame élastique), ce qui rend impossible la lecture des lames avec un système d'épifluorescence classique. Ce phénomène implique que les images acquises en microscopie confocale, le sont en aveugle, sans à priori sur le résultat.

Le marquage de l'actine polymérisée par la phalloïdine nous a permis d'observer l'organisation structurale de la carotide, avec les cellules endothéliales étirées parallèlement au flux sanguin, les lames élastiques (visualisées par leur autofluorescence sur le canal bleu) et les CML (Cellules musculaires Lisses) orientées perpendiculairement par rapport aux cellules endothéliales (*Figure 47A* et *Figure 47B*). Dans nos premiers cribles pour expérimenter cette approche technique, nous avons choisi d'utiliser un marquage actine/vinculine, afin de rechercher des structures *in vivo* qui se présenteraient de la même façon que ceux obtenus par les marquages *in vitro* des cellules endothéliales aortiques bovines (BAE) en culture. En avons d'abord analysé la structure de l'endothélium quiescent, en absence de stimulation ou de ligature. Le marquage des cellules endothéliales *in situ* dans la carotide diffère significatives de celui obtenu avec des cellules endothéliales aortiques bovines en culture *in vitro* (*Figure 47C*). Les BAE en culture présentent des fibres de stress et des points focaux où localise la vinculine (aux extrémités de ces fibres d'actine), qui n'existent pas dans les cellules de l'endothélium de la carotide fixées *in vivo*. Dans ces cellules, la vinculine apparait à la périphérie de la cellule, colocalisant avec l'actine (*Figure 47C*). Nous avons confirmé par que ces cellules sont bien d'origine endothéliale en révélant la présence de la VE-cadhérine (marqueur spécifique des cellules endothéliales) (*Figure 47D*).

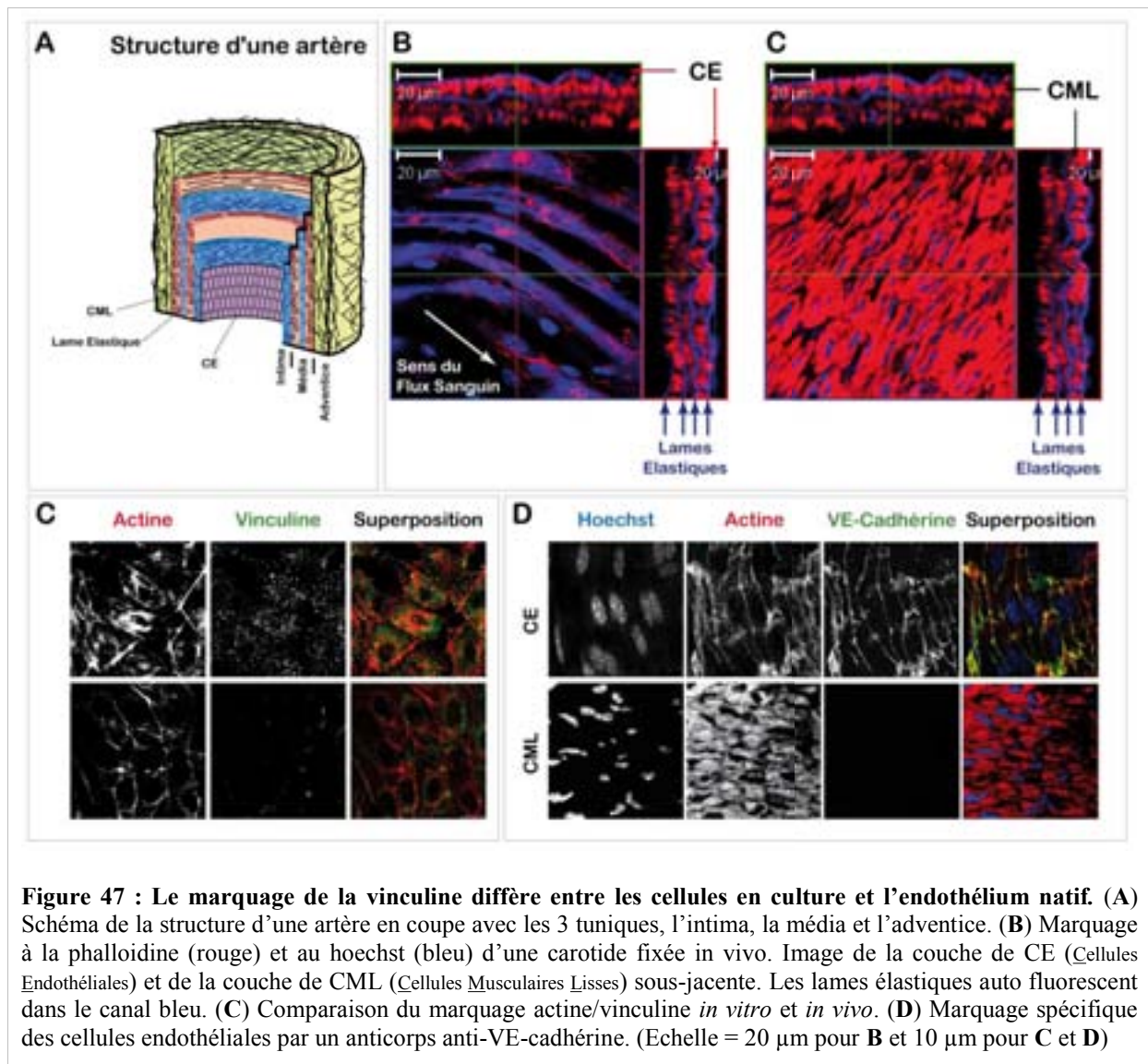
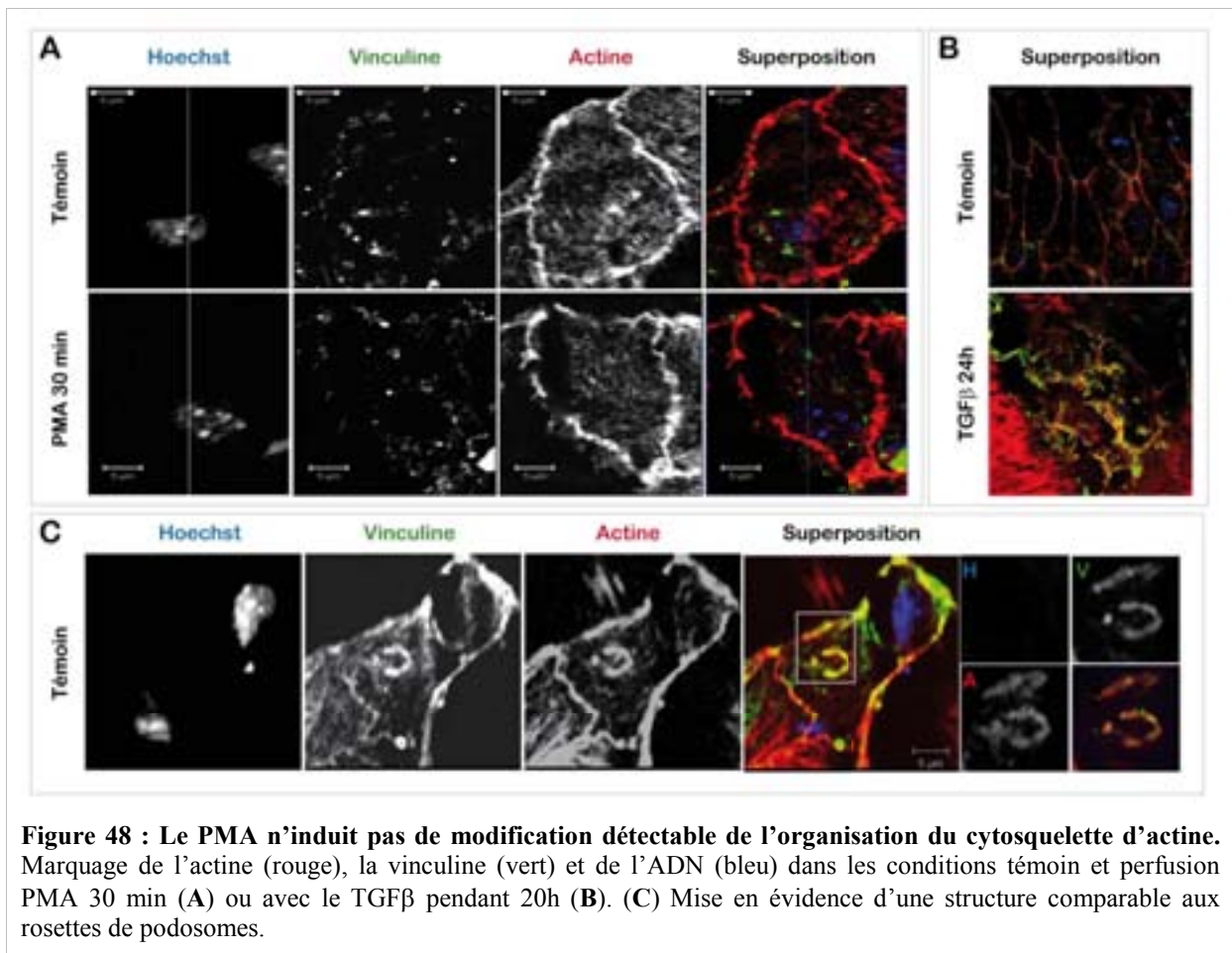


Figure 47 : Le marquage de la vinculine diffère entre les cellules en culture et l'endothélium natif. (A) Schéma de la structure d'une artère en coupe avec les 3 tuniques, l'intima, la média et l'adventice. (B) Marquage à la phalloïdine (rouge) et au hoechst (bleu) d'une carotide fixée *in vivo*. Image de la couche de CE (Cellules Endothéliales) et de la couche de CML (Cellules Musculaires Lisses) sous-jacente. Les lames élastiques auto fluorescent dans le canal bleu. (C) Comparaison du marquage actine/vinculine *in vitro* et *in vivo*. (D) Marquage spécifique des cellules endothéliales par un anticorps anti-VE-cadhérine. (Echelle = 20 µm pour B et 10 µm pour C et D)

II - Le modèle de chambre d'incubation ne convient pas à l'étude des podosomes *in vivo*

Nos premières approches du problème ont été réalisées dans le modèle de la « chambre d'incubation ». Dans ce modèle nous avons voulu tester l'effet de substances décrites comme des inducteurs des podosomes dans les cellules endothéliales en culture. Tout d'abord, un ester de phorbol, le PMA (Phorbol 12-Myristate 13-Acetate) qui a été décrit comme inducteur des podosomes dans les cellules endothéliales après 30 min de stimulation à une concentration de 80 nM (Tatin *et al.*, 2006). Nous avons aussi utilisé le TGFβ à une concentration de 5 ng/mL pendant 20h (Varon *et al.*, 2006). La stimulation par le PMA de l'endothélium pendant 30 min n'induit pas de remaniements majeurs (Figure 48A). La stimulation par le TGFβ, quant à elle, induit une désorganisation profonde de l'endothélium (Figure 48B). Nous avons pu observer une structure dans laquelle actine et vinculine colocalisent, sous une présentation

comparable à celle des rosettes de podosomes qu'une seule fois dans une préparation issue d'un animal témoin, perfusé avec une solution de PBS à la place du PMA (*Figure 48C*). Cette observation nous a suggéré que les lésions créées par les ligatures apportaient des conditions propices à la formation des podosomes sans nécessité d'autre stimulation de l'endothélium. Nous avons donc mis en place une autre approche, dans laquelle la lésion apporte le stimulus déclencheur du remodelage du cytosquelette d'actine.



En effet, il a été montré que les perturbations du flux sanguin sont associées à la production de TGFβ (Sho *et al.*, 2002 ; Xu *et al.*, 2002a). Par ailleurs, la perturbation du flux sanguin en réponse à l'occlusion créée expérimentalement par la ligature d'une artère induit l'expression d'une des chaînes du complexe récepteur du TGFβ, Alk1 en amont de la lésion (Seki *et al.*, 2003). Sur la base de ces observations, nous avons développé un deuxième modèle, dit modèle de la « Lésion ». Dans ce modèle nous observé qu'après 24h, la partie ischémisée de la carotide perd son endothélium. Par contre l'observation de la partie « reflux » de la carotide (en amont de la ligature) nous permis de mettre en évidence que la structure globale de l'endothélium n'est pas modifiée. Cependant nous avons pu mettre en évidence des

structures ressemblant à des rosettes de podosomes à la face ventrale des cellules endothéliales (juste au-dessus des CML), avec un marqueur des podosomes, la cortactine. Les comptages de ces structures sur une dizaine d'expériences nous ont permis de montrer un faible taux de rosettes de 3,7 % ($\pm 1\%$; $n=370$) après 24h de reflux et de 5,8% ($\pm 0.4\%$; $n=346$) à 48h. Ce taux est faible et difficile à valider statistiquement sans augmenter la taille de l'échantillon. La collecte des données est toujours en cours. L'authentification de ces structures en tant que podosomes constitue une deuxième étape. Nous avons déjà validé la présence de la vinculine (*Figure 48*) et de la cortactine (*Figure 49*). Nous compléterons cette caractérisation avec les autres marqueurs spécifiques que sont la dynamine 2, la gelsoline et N-WASP.

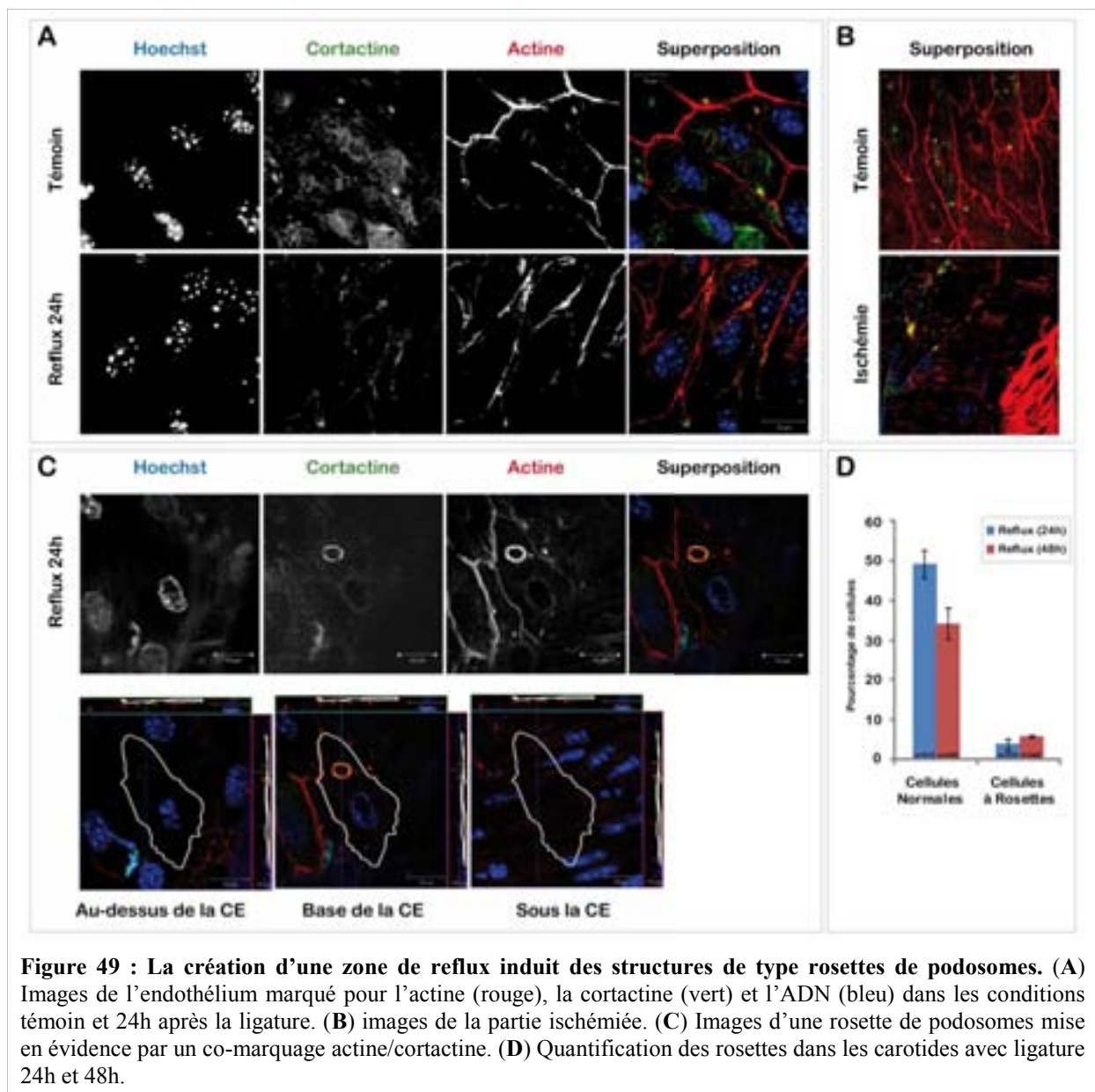


Figure 49 : La création d'une zone de reflux induit des structures de type rosettes de podosomes. (A) Images de l'endothélium marqué pour l'actine (rouge), la cortactine (vert) et l'ADN (bleu) dans les conditions témoin et 24h après la ligature. (B) images de la partie ischémique. (C) Images d'une rosette de podosomes mise en évidence par un co-marquage actine/cortactine. (D) Quantification des rosettes dans les carotides avec ligature 24h et 48h.

Pour savoir si il existe une relation entre le taux de rosettes mesuré dans les carotides et le TGF β qui serait produit et libéré localement en réponse à la ligature, nous avons utilisé un inhibiteur de la signalisation des récepteurs du TGF β de type I, le SB431542 (DaCosta Byfield *et al.*, 2004 ; Laping *et al.*, 2002). L'inhibiteur est injecté par voie systémique dans la veine saphène dans l'heure qui précède la mise en place de la ligature et de façon à atteindre une concentration finale de 10 μ M dans le sang. Le contrôle est réalisé avec le solvant du SB431542, le DMSO. Il a été montré qu'à cette concentration le SB431542 est efficace jusqu'à 3 jours (). Pour vérifier l'action du SB431542 nous avons utilisé un marquage des formes phosphorylées des SMAD1/5 qui sont des facteurs de transcription activés directement au niveau des récepteurs du TGF β de type I, Alk1. Nous avons observé que le marquage phospho-SMAD1/5 est nucléaire. Dans les animaux témoins (qui subissent la chirurgie mais pas la ligature) le marquage phospho-SMAD1/5 est faible et les cellules ne sont pas toutes marquées. En revanche chez les animaux ayant subi la ligature, on observe une augmentation sensible de l'intensité et de la fréquence du marquage. Le marquage nucléaire par le colorant hoechst étant relativement homogène, nous avons été en mesure de quantifier le marquage phospho-SMAD1/5 en calculant le rapport intensité_{P-SMAD}/intensité_{Hoechst}. Cette méthode nous a permis de montrer que le SB431542 induit une diminution de l'intensité du marquage phospho-SMAD1/5 que se soit dans les animaux témoins (de 4,2 \pm 1,4 à 1,4 \pm 0,9), ou les animaux ayant subi la ligature pendant 48h (de 2,29 \pm 0,27 à 0,77 \pm 0,25). Cette inhibition est statistiquement significative (* :p<0,05). Ce résultat valide la technique de quantification. Il nous indique aussi que la ligature induit une augmentation de la phosphorylation de SMAD1/5, ce qui corrèle avec l'hypothèse d'une augmentation locale de la concentration de TGF β (production et relargage de la matrice extracellulaire). La prochaine étape sera la quantification des rosettes de podosomes dans cette situation, afin de déterminer l'impact de l'inhibition des effets du TGF β par le SB431542 sur la formation des rosettes.

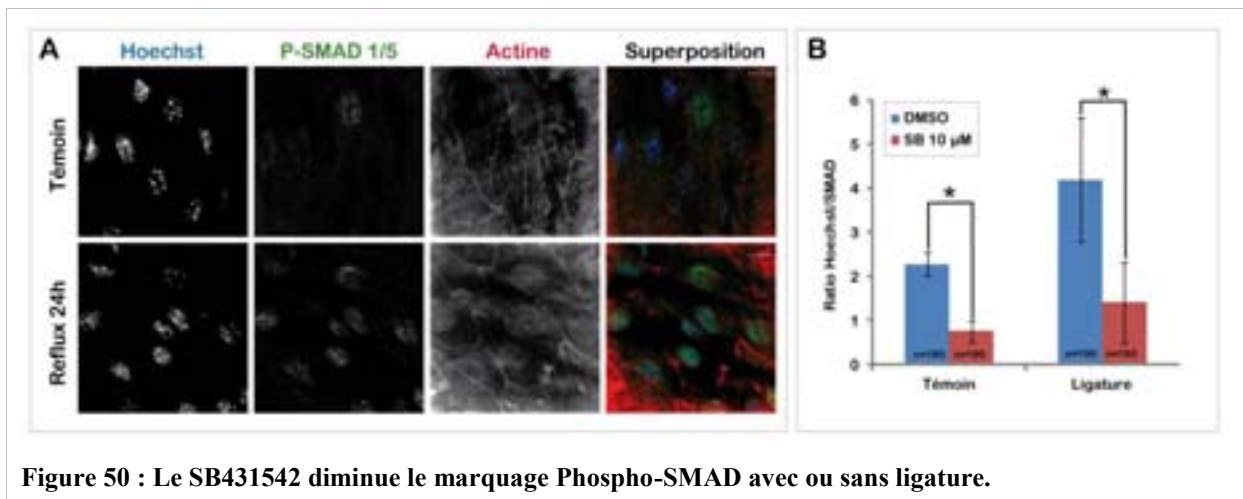


Figure 50 : Le SB431542 diminue le marquage Phospho-SMAD avec ou sans ligature.

Section IV : Conclusion

L'observation des podosomes *in vivo* est une arlésienne pour beaucoup de chercheur. Il est vrai que ce type de structure a été décrit pour la première fois il y a plus de 25 ans. Cependant notre étude est peut être la première vers la caractérisation de telles structures *in vivo*. Nos résultats mettent en évidence des structures compatibles avec les podosomes en rosettes dans les cellules endothéliales de carotides, ce qui corrèle avec les résultats obtenus *in vitro* sur les cellules BAE en réponse au TGF β (Varon *et al.*, 2006). Nous souhaitons donc continuer cette approche, notamment en développant une collaboration avec Franck LEBRIN (INSERM U525, Paris), pour travailler avec des souris génétiquement modifiées au niveau des gènes des gènes codant pour les récepteurs du TGF β . Cette collaboration est en cours de mise en place et les animaux seront bientôt à notre disposition.

Discussion Générale

La compréhension des mécanismes de survie cellulaire est un enjeu majeur en thérapie anticancéreuse, mais aussi dans le traitement de maladie auto-immunes ou neurodégénératives. Parmi les étapes de l'oncogenèse, la perte de la sensibilité à l'apoptose qui engendre la survie de cellules destinées à être éliminées, constitue un évènement majeur. A plus ou moins long terme la modification des propriétés d'adhérence des cellules permet une croissance indépendante d'ancrage, qui, associée aux propriétés de dégradation de la matrice extracellulaire, favorise l'envahissement d'autres tissus. L'ensemble de ce travail (et celui du laboratoire en général) met en avant une relation entre la régulation des Rho GTPases et l'oncogenèse, au travers de la régulation de la survie cellulaire (en régulant directement l'activité d'une kinase impliquée dans la survie cellulaire (voie Rac-Akt), ou indirectement en régulant négativement l'activité de cellules tumorales (réponse des tricholeucocytes à l'IFN α)) et/ou des propriétés migratoires et invasives des cellules (structures d'adhérence impliquées dans l'invasion, telles que les podosomes (Moreau *et al.*, 2003), morphologie atypique traduisant une mobilité (observée en vidéo microscopie), et sans doute des propriétés invasives importantes (les tricholeucocytes)).

La survie cellulaire est le résultat de l'intégration de nombreux signaux issus de l'environnement et il est clair que pour la majorité des cellules, les signaux de survie médiés par les phénomènes d'adhérence sont primordiaux, la perte de ceux-ci induisant l'apoptose (anoïkis) (Frisch & Ruoslahti, 1997). Cependant, certaines situations physiologiques (les lymphocytes mémoires) et pathologiques (processus invasifs et métastatiques) nous montrent que ces signaux peuvent être « court-circuités » par d'autres mécanismes, impliquant certainement des facteurs de croissance ou des cytokines. La mise en évidence d'une nouvelle voie d'activation de la kinase Akt par la GTPase Rac dans les cellules non adhérentes ouvre une porte vers la compréhension de la survie des cellules non adhérentes au long court.

Le caractère anti-apoptotique de la GTPase Rac a souvent été décrit mais les mécanismes impliqués dans ce rôle n'ont pas été pas été caractérisés. Mes travaux de thèse ont permis d'avancer dans la caractérisation d'un mécanisme possible d'induction de la survie cellulaire dans une situation particulière dans laquelle les cellules ne sont pas adhérentes. Cette singularité va à l'encontre du modèle d'activation de Rac communément admis, selon lequel l'engagement des intégrines est nécessaire et suffisant pour induire l'activation de Rac et la transduction du signal (del Pozo *et al.*, 2000), et ceci en créant des sites à la membrane où toutes les molécules impliquées dans la signalisation de Rac sont présentes (GEFs,

GTPase, effecteurs). Cependant dans les cellules non adhérentes de tels sites n'existent par définition pas, et pourtant les Rho GTPases sont activables et activées. L'absence de description de sites de recrutement de la machinerie des GTPases dans les cellules non adhérentes, ne signifie pas qu'ils n'existent pas, mais seulement qu'ils prennent une autre forme. Les intégrines n'intervenant pas, les récepteurs des facteurs de croissance et des cytokines représentent une alternative envisageable pour la création de tels sites. De plus, la nature plus « labile » et moins localisée de ces récepteurs (qui peuvent se déplacer tout autour de la cellule, contrairement aux intégrines engagées qui constituent des points d'ancrage fixes) pourrait expliquer la difficulté à mettre de tels sites en évidence dans des cellules non adhérentes. Plusieurs récepteurs peuvent remplir ce rôle, le récepteur T (Genot *et al.*, 2000) ou l'IL-15 (ce travail). La validation des résultats obtenus avec l'IL-15 sur les cellules Kit 225 nous permettrait d'avoir à notre disposition, un 2^{ème} modèle d'activation d'Akt par Rac en réponse à une cytokine et à partir de là d'étudier les mécanismes impliqués dans l'activation de Rac dans ce contexte (GEFs).

Le statut de la phosphatase SHIP dans notre modèle en fait un régulateur négatif de l'activation d'Akt par Rac dans les cellules adhérentes. Les phénotypes observés chez les souris KO pour SHIP1 et SHIP2 qui entre autres présentent une splénomégalie, une hématopoïèse extra médullaire, des infiltrations des cellules myéloïdes dans les poumons (Helgason *et al.*, 1998) et une ostéoporose induite par un nombre trop élevé d'ostéoclastes associé à une augmentation de leur activité (Takeshita *et al.*, 2002) sont les manifestations d'une hématopoïèse augmentée et ont été mis en relation avec une hypersensibilité des cellules aux cytokines (Liu *et al.*, 1999; Helgason *et al.*, 1998) et aux chemokines (Kim *et al.*, 1999). Ces observations sont compatibles avec la voie de signalisation que nous décrivons, qui doit dépendre d'un facteur de croissance (cytokine, chemokine,...) pour l'activation de Rac et dans laquelle la perte de l'expression de SHIP permet l'activation d'Akt par Rac (une forme d'hypersensibilité).

Un mécanisme possible expliquant le rôle inhibiteur de SHIP dans les cellules adhérentes, serait l'existence d'une localisation différentielle de SHIP entre cellules adhérentes et non adhérentes. Dans les cellules adhérentes SHIP est localisée au niveau des adhérences focales, qui représentent les sites majeurs d'activation de Rac dans ces cellules. Il a été montré que SHIP2 interagit avec l'adaptateur p130Cas, nous avons étendu cette interaction à SHIP dans les cellules A20. Ainsi, dans les cellules adhérentes SHIP et Rac sont localisés aux mêmes sites, ce qui pourrait inhiber l'activation d'Akt par Rac. Dans les cellules

non adhérentes on ne sait pas où Rac est activée et SHIP peut être recrutée à la membrane par plusieurs adaptateurs en réponses à différents facteurs de croissance (Gab2, Dok2,...), une hypothèse pour expliquer le « non effet » de SHIP sur notre voie de signalisation serait que SHIP et Rac ne sont recrutés sur les mêmes sites. Pour valider cette hypothèse il nous faudra mettre en évidence des différences de localisation de SHIP et de Rac (molécules endogènes), dans un système dans lequel l'activateur pourra être UCHT1 (activateur du TCR), IL-15 par exemple.

La mise en évidence d'un complexe contenant Akt et Rac a été discutée précédemment, mais les implications sur la poursuite des travaux de caractérisation de ce complexe et plus particulièrement du rôle de la PI3K méritent que l'on y revienne. Nos résultats préliminaires montrent que la sous-unité p85 est présente dans le complexe Rac-Akt, l'étape suivante sera d'identifier quel isoforme de p85 est impliqué, puis de déterminer le rôle de la PI3K, et plus particulièrement du domaine BH de la sous-unité p85 dans les mécanismes qui régulent cette voie. Dans cet objectif, G. ANIES a élaboré une batterie de mutants des sous unités p85 α et β pour permettre d'explorer le couplage de Rac à Akt via la p85. Les anticorps spécifiques des formes p85 α et p85 β sont tous dirigés contre le BH parce que cette région est celle de plus grande divergence entre les deux isoformes de p85. De ce fait, ces anticorps ne peuvent pas être utilisés pour précipiter p85 du complexe mis en évidence dans les cellules en suspension, où, d'après nos hypothèses, ces domaines sont engagés dans des interactions protéine-protéine et donc masqués et inaccessibles aux anticorps. L'utilisation des domaines BH isolés nous a permis de vérifier la liaison du BH α à Rac, celle de BH β est encore à l'étude. Dans une deuxième étape, des approches biochimiques, d'immunofluorescence et des tests fonctionnels nous permettront de vérifier leur capacité à entrer en compétition avec les protéines endogènes p85 α ou β *in vitro*, pour évaluer leur capacité à entrer en compétition avec le complexe d'intérêt, et évaluer les contributions respectives des sous-unités p85 α et p85 β dans cette voie de régulation. L'éventualité d'un effet agoniste de ces domaines BH isolés sur l'activation d'Akt sera également explorée. En effet, les données de la littérature attribuent des rôles distincts à ces deux sous-unités, p85 β étant souvent considérée comme régulant négativement les fonctions médiées par le complexe p85 α -p110 (Deane *et al.*, 2004) et de ce fait, les domaines BH α et BH β pourraient avoir des effets distincts. Nous avons maintenant vérifié que les mutant p85 Δ BH α ou β conservent leur capacité à lier p110 et donc n'interfèrent pas avec l'activité de la PI3K (Chamberlain *et al.*, 2004) et il sera intéressant de vérifier s'ils affectent l'activation de Akt par Rac. Des résultats préliminaires obtenus en spectrométrie de masse (en collaboration avec J.M. SCHMITTER, IECB, Bordeaux), nous

ont permis de montrer que les domaines BH α ou BH β isolés peuvent s'homodimériser mais l'hétérodimérisation de BH α et BH β est encore à l'étude.

L'étude de la liaison de ces domaines à V12Rac, puis Rac-GTP (en utilisant Rac-GTP γ S) permettra de déterminer si cette exploration peut être continuée à des fins thérapeutiques. En effet, si les domaines BH isolés peuvent déplacer Rac-GTP du complexe, nous pourrions alors les utiliser pour inhiber l'activation d'Akt par Rac-GTP endogène. En effet, nos travaux permettraient alors d'identifier de nouvelles cibles d'intérêt thérapeutique et ouvrant ainsi de nouvelles perspectives pour cibler sélectivement les populations de cellules non adhérentes (ou peu adhérentes), indépendamment des autres populations, dans lesquelles nous pensons que cette voie de survie joue un rôle majeur, avec des applications dans le traitement des leucémies, le contrôle de la vascularisation des tumeurs ou l'inhibition du processus métastatique. Les expériences futures montreront si le domaine BH de p85 (α ou β) peut être un point de départ dans l'élaboration d'un tel inhibiteur. La validation d'une telle hypothèse ouvrirait la voie au développement d'une nouvelle classe d'inhibiteurs de la PI3K spécifiques des PI3Ks de classe IA (p85 dépendantes).

Parallèlement à la mise en évidence de cette voie d'activation d'Akt par la GTPase Rac, nos travaux de recherche sur la leucémie à tricholeucocytes ont permis de mettre en relation le phénotype atypique de ces cellules, qui présentent de long prolongements cytoplasmiques et l'activité constitutivement élevée de Rac et Cdc42, *in vitro* (Chaigne-Delalande *et al.*, 2006). En thérapeutique, cette pathologie est extrêmement sensible à l'IFN α (Quesada *et al.*, 1984). Lors de l'administration d'IFN α chez les patients, on assiste à une chute très rapide du nombre de Tricholeucocytes dans le sang alors que les cellules malignes ne disparaissent que très progressivement de la rate et la moelle et du foie. Il est admis que les tricholeucocytes sanguins sont éliminés par un processus apoptotique (Baker *et al.*, 2002). Nous avons montré que dans les tricholeucocytes, l'IFN α réduit l'activité de Rac (probablement via Cdc42) par un processus dépendant de RhoA et p53 (Chaigne-Delalande *et al.*, 2006). Dans notre étude, seul le cas des cellules en suspension a été analysé mais il serait informatif d'examiner si la même réponse des tricholeucocytes est obtenue lorsque les tricholeucocytes sont adhérents sur la fibronectine. En effet, les données issues de la littérature montrent que l'IFN α induit (indirectement, via le TNF α) l'apoptose des tricholeucocytes mais précisent que ces cellules tumorales deviennent beaucoup moins vulnérables à l'apoptose si elles sont adhérents sur la fibronectine (Baker *et al.*, 2002). Cette observation d'une régulation différentielle de la survie des tricholeucocytes dans cette situation mettent clairement en évidence la mise en jeu de

mécanismes de régulation distincts. Les interactions avec le stroma et/ou les cellules au sein des différents tissus génèrent des signaux de survie qui apparaissent distincts de ceux des tricholeucocytes en suspension. La voie d'activation d'Akt par Rac dans les tricholeucocytes non adhérents peut être un de ces mécanismes. En étudiant la régulation d'Akt par Rac dans les tricholeucocytes adhérents et non adhérents, nous travaillerions dans un 3^{ème} modèle d'étude de cette voie de signalisation, pathologique cette fois.

RhoA, Rac1 et Cdc42 ne sont pas les seules GTPases pouvant jouer un rôle dans le phénotype des tricholeucocytes. Un mutant constitutivement actif de TC10 (L75TC10) est capable d'induire la formation de long filopodes dans les fibroblastes (Murphy *et al.*, 1999). Il serait intéressant d'évaluer le statut de cette GTPase dans les tricholeucocytes. La GTPase Wrch (Chp) est aussi intéressante, car elle a été impliquée dans des processus de transformation particuliers, du fait de son extrémité C-terminale atypique, qui contrairement à la majorité des Rho GTPases n'est pas isoprénylée, mais est palmitoylée, de plus elle n'est pas régulée par les GDIs (Chenette *et al.*, 2006). Ces éléments laissent supposer que cette GTPase ne serait probablement pas régulée par des inhibiteurs de la prénylation des GTPases tels que les bisphosphonates ou les statines, utilisés en thérapeutiques anti-cancéreuse.

Enfin, nos travaux ont permis de donner une signification physiologique à des structures d'adhérence décrite jusqu'ici *in vitro* seulement : les podosomes, en les mettant en évidence *in vivo*. Une des premières description *in vitro* de ces structure d'adhérence particulières a été faite dans les tricholeucocytes (Caligaris-Cappio *et al.*, 1986). Le rôle des podosomes n'est pas encore établi. Le contenu protéique de ces structures, intégrines, MMPs, et l'activité de dégradation de la matrice mesurable *in vitro*, laissent supposer un rôle dans la migration et/ou l'invasion (via la dégradation de la MEC) *in vivo*. Nos observations réalisées dans l'endothélium natif ouvrent la porte à la caractérisation de ce(s) rôle(s) dans les mécanismes d'invasion, dans un contexte d'induction de l'angiogénèse. Cette étude qui s'inscrit dans la continuité du travail de Violaine MOREAU, Florence TATIN et Christine VARON sera poursuivie par Patricia ROTTIERS et Frédéric SALTEL au laboratoire.

Matériel et Méthodes

La plupart des réactifs biochimiques et biologiques et des protocoles expérimentaux utilisés ont été décrits dans les sections *Material and Methods* des articles 1 et 2. Cette brève section présente succinctement les techniques complémentaires utilisées.

Section I Biologie cellulaire

I - La culture cellulaire

Les différentes lignées cellulaires sont cultivées, à 37°C et 5% de CO₂ sauf les Lymphocytes B DT40 qui sont cultivés à 40°C. Dans tous les cas le milieu de culture (indiqué dans le *Tableau 17*) est supplémenté avec 10% de SVF^(Globepharm) (Sérum de Veau Fœtal) décomplémenté, 100 UI/L de pénicilline^(Gibco, BRL) et 100 µg/L de streptomycine^(Gibco, BRL). Les autres compléments tels que le βME (β-Mercapto-Ethanol)^(Gibco, BRL), les agents de sélection : hygromycine B^(Calbiochem) et puromycine^(Calbiochem) ou les cytokines (détaillée page 176), sont indiqués dans le *Tableau 17*.

II - Transfection

Pour la plupart des lignées cellulaires utilisées, la méthode de transfection utilisée est la méthode d'électroporation. Les cellules sont comptées et mises en suspension à la concentration optimale dans 500 µL de milieu de culture sans sérum dans une cuvette d'électroporation^(Bio-Rad) (largeur 0,4 cm). La quantité de plasmide désirée est ensuite ajoutée. Après homogénéisation, la cuvette est placée dans l'électroporateur (Gene Pulser Xcell[®]^(Bio-Rad)). Les cellules sont alors pulsées avec un champ électrique de 250 à 320 V et de 900 à 1100 µF. Les conditions précises pour chaque lignée sont décrites dans le *Tableau 17*. Après 5 min de repos, les cellules électroporées sont transférées dans 5 mL de milieu de culture complet et mises en culture dans les conditions adéquates.

Seule exception à ce protocole, la transfection des cellules UMUC3, qui a été effectuée avec la lipofectamine^(Invitrogen) en suivant les instructions du fournisseur. Les quantités d'ADN transfectées sont gardées constantes par complément avec le vecteur vide.

Nom	Type Cellulaire	Origine	Culture cellulaire			Electroporation		
			Adh	Milieu	Compléments	Cellules	V	μ F
Jurkat (clone JHM1)	Lymphocytes T	Humaine	NA	RPMI		15.10^6	250	950
HPB ALL	Lymphocytes T	Humaine	NA	RPMI		15.10^6	250	950
DT40 wt	Lymphocytes B	Aviaire	NA	RPMI	Sérum de Poulet (1%) et β ME (50 μ M) Culture à 40°C	15.10^6	250	950
DT40 SHIP-/-	Lymphocytes B	Aviaire	NA	RPMI		20.10^6	320	1050
A20	Lymphocytes B	Murine	Adh/ NA	RPMI	β ME (50 μ M)	20.10^6	320	1050
RBL	Mastocytes	Rat	Adh/ NA	DMEM		10.10^6	250	950
U937	Monocytes	Humaine	NA	RPMI		10.10^6	250	950
Raw 264.7	Macrophages	Murine	Adh	DMEM		10.10^6	250	950
K-562	MLC	Humaine	NA	RPMI		10.10^6	250	950
Kit 225	Lymphocytes T CD8	Humaine	NA	RPMI	5 ng/mL IL-2	15.10^6	320	1050
CTLL-2	Lymphocytes T CD4	Murine	NA	RPMI	2 ng/mL IL-2	10.10^6	320	1050
HCLL7076	Tricholeucocyte	Humaine	NA	RPMI		15.10^6	310	950
Eskol	Tricholeucocyte	Humaine	NA	RPMI		10.10^6	320	1100
BL41	Tricholeucocyte	Humaine	NA	RPMI				
PAE wt	Cellules Endothéliales	Porcine	Adh	Ham F12		10.10^6	250	950
PAE V12Rac	Cellules Endothéliales	Porcine	Adh	Ham F12	Sélection : Hygromycine B (100 μ M) ; Puromycine (500 mM) Induction : IPTG (0,01M)	10.10^6	250	950
PAE N17Rac	Cellules Endothéliales	Porcine	Adh	Ham F12		10.10^6	250	950
BAE	Cellules Endothéliales	Bovine	Adh	BAE	Milieu et sérum spécial			
HeLa S3	Carcinome	Humaine	Adh/ NA	DMEM		10.10^6	250	950
UMUC3	Carcinoma vésical	Humaine	Adh	DMEM				

Tableau 17 : Conditions de culture Cellulaires et d'électroporation des différentes lignées utilisée

III - Les tests cellulaires

A - Les tests de proliférations

Pour les tests de proliférations, les cellules sont lavées deux fois dans un milieu de culture sans sérum, puis déprivées 4h (cellules A20) ou 48h (cellules Kit 225) dans l'incubateur en milieu de culture sans sérum. Les tests de prolifération ont été réalisés dans des plaques 12 puits à fond plat à raison de $10 \cdot 10^5$ cellules par puits dans les différentes conditions indiquées. Les cellules sont ensuite mises en culture à 37°C sous 5% de CO₂. Aux temps indiquées, les cellules sont homogénéisées, 20 µL de milieu de culture sont prélevés, dilués au demi avec une solution de bleu trypan 15%^(SIGMA). Les cellules sont alors comptées 2 fois sur cellules de Mallassez.

B - Les tests d'adhérence

Pour les tests d'adhérence les cellules sont lavées 2 fois en milieu de culture sans sérum, puis $2 \cdot 10^6$ cellules sont mises en culture dans un puits de plaque 6 puits à fond plat. Aux temps indiqués les cellules non adhérentes et adhérentes sont prélevées, lavées une fois en PBS et comptées sur cellule de Mallassez en duplicate.

C - Test d'apoptose

Pour les tests d'apoptose, $10 \cdot 10^6$ PAE et PAE V12Rac sont mises en culture sur des boîtes (14 cm) de culture cellulaire (condition adhérente) ou de culture bactérienne (condition non adhérente) en présence de 0,1 mM d'IPTG et cela en présence ou en absence de 10µM d'inhibiteur d'Akt (Akt Inhibitor I^(Calbiochem)). Après 24h, les cellules sont collectées et l'apoptose est détectée par un marquage annexine V-FITC^(BD) – iodure de propidium^(SIGMA) à température ambiante pendant 30 min à l'obscurité. Les cellules marquées sont ensuite passées au cytomètre en flux (EPICS[®] XL^(Coulter)). Les résultats sont obtenus grâce au logiciel EXPO32[®].

Section II Biologie Moléculaire

I - Les plasmides utilisés

Les différents plasmides utilisés sont cités dans le texte.

II - Les techniques de bases

A - Transformation de bactéries

1 - Préparation de bactéries compétentes

Pour permettre la transformation des bactéries celles-ci doivent être rendues compétentes. Pour cela, on ensemence 10 mL de milieu LB (Luria Broth^(EUROMEDEx)) avec une colonie de bactérie DH5 α . La suspension bactérienne est mise en culture à 37°C sous agitation sur la nuit. Les 10 mL de culture bactériennes sont ensuite ajoutés à 200 mL de LB et remis en culture jusqu'à obtention d'une DO à 550 nm de l'ordre de 0,5 (environ 2h). Les bactéries sont ensuite centrifugées à 5000 rpm pendant 10 minutes. Le culot est déposé dans la glace et repris dans 80 mL de tampon I froid (KCH₂COOH 30 mM, KCl 100 mM, CaCl₂ 10 mM, MnCl₂ 50 mM, Glycérol 15%). Après avoir laissé la suspension sur glace pendant 30 minutes, les bactéries sont centrifugées à 5000 rpm pendant 10 minutes. Le culot est ensuite repris dans 16 mL de tampon II (MOPS 10 mM, KCl 10 mM, CaCl₂ 75 mM, Glycérol 15%) et la suspension laissée sur glace pendant 30 minutes. Enfin, la suspension est aliquotée par 500 μ l dans des cryotubes^(VWR) et stockée à -80°C.

2 - Transformation des bactéries par choc thermique

Pour la transformation des bactéries compétentes, l'ADN à transformer est préparé dans 10 μ L d'eau distillée (entre 5 et 10 ng d'ADN). Ces 10 μ L sont ajoutés à 100 μ L de suspension de bactéries compétentes et laissés sur glace pendant 30 minutes. Les bactéries subissent ensuite un choc thermique pendant 2 min à 42°C, puis sont remises sur glace pendant 5 minutes. On ajoute ensuite 900 μ L de LB à 37°C sur la suspension bactérienne et on remet l'ensemble à 37°C sous agitation pendant 1 heure. La suspension est ensuite centrifugée et reprise dans 50 à 100 μ L de LB qui vont être déposés sur boîtes de LB AGAR 5% supplémentées avec l'antibiotique de sélection. Les boîtes sont mises en culture toute la nuit à 37°C. La qualité de l'ADN transformé est ensuite vérifiée par des mini-préparations.

B - Préparation d'ADN plasmidique par maxi-préparation

1 - Méthode QIAgen

Pour cette méthode, 400 mL de milieu LB supplémenté avec l'antibiotique de sélection sont ensemencés avec des bactéries transformées par le plasmide désiré. Après une nuit à 37°C sous agitation les bactéries sont centrifugées et l'ADN plasmidique récupéré grâce à un kit Maxi-Prep^(QIAgen). Brièvement, le culot bactérien subit une lyse, puis l'ADN chromosomal est floculé par variation du pH. Le surnageant de cette étape va être passé sur une colonne échangeuse d'anions qui va retenir l'ADN plasmidique. Après élution et précipitation de

l'ADN plasmidique à l'isopropanol, l'ADN est repris dans un volume d'eau bidistillée. La concentration et la pureté de l'ADN recueilli sont évaluées à partir de la mesure de la DO à 260 et 280 nm.

2 - Méthode CsCl

Dans cette méthode, les bactéries sont mises en culture dans un milieu plus riche, le TB (Terrific Broth). Une culture de 400 mL de bactéries poussée sur la nuit à 37°C sous agitation est centrifugée à 5000 rpm pendant 15 minutes. Le culot bactérien est lysé, et l'ADN chromosomal flocculé. Les acides nucléiques présents dans le surnageant de cette étape sont précipités à l'isopropanol (2/3 surnageant-1/3 isopropanol). Après resuspension en eau bidistillée, l'ARN est précipité avec de l'acétate d'ammonium 5M. Le surnageant est ensuite précipité volume à volume à l'éthanol absolu. Le culot est repris dans de l'eau bidistillée et la solution d'ADN va ensuite être soumise à un gradient de CsCl en présence de bromure d'ethyidium (BET) (centrifugation à 80000 rpm à 22°C toute la nuit). A l'issue de cette séparation l'ADN marqué au BET est récupéré, le BET extrait au butanol et l'ADN repris en eau distillée. Comme précédemment la concentration et la qualité de l'ADN récupéré sont évaluées par mesure de la DO à 260 et 280 nm.

III - Sous-clonage d'un fragment d'ADN dans un plasmide

A - Généralités

Suite à des problèmes techniques avec la protéine V12Rac1 C189S-GFP, nous avons décidé de générer un mutant HA-L61Rac1 C189S. Pour cela nous avons utilisé 2 méthodes, un sous-clonage et la mutagenèse dirigée.

B - Méthode de sous-clonage

La séquence de la protéine Rac possède un site de restriction unique pour l'enzyme Not1 en son centre. L'insert codant pour la protéine Rac est cloné entre les sites Bam HI et Eco RI dans le vecteur pGEX2 L61Rac1. Nous avons utilisé ce plasmide pour générer un fragment de 146 pb entre les sites Not1 et Eco RI à partir du plasmide pcDNA3 Rac1 (wt) C189S. La même digestion du plasmide pGEX2 L61Rac1 nous a permis de recueillir un fragment de 4,5 kb contenant le vecteur pGEX2 et la partie N-terminale de L61Rac1. Ces 2 fragments ont ensuite été purifiés sur gel d'agarose à l'aide d'un kit d'extraction d'ADN (STRATAGENE). Après avoir contrôlé la taille des 2 fragments purifiés sur gel, ceux-ci sont ligués avec la ligase⁰ pendant 2h à température ambiante. Les différents produits de ligation ont ensuite été utilisés pour transformer des bactéries compétentes comme décrit précédemment. Les différentes colonies obtenues ont été mises en culture liquide dans 5 mL de LB supplémenté avec

l'antibiotique de sélection pour la nuit à 37°C sous agitation. L'ADN de ces culture à été extrait par mini-préparation et envoyer à séquencer ^(MWG BIOTECH). Une fois validé, un clone a été amplifié et sous-cloné dans le plasmide pRK5-HA entre les sites Bam HI et Eco RI.

Section III Biochimie

I - Anticorps

Les principaux anticorps utilisés sont listé dans le tableau suivant :

Protéine	Fournisseur	Protéine	Fournisseur
T ³⁰⁸ Akt	CST	p85β (T15)	SEROTEC
S ⁴⁷³ Akt	CST	ERK 1/2	CST
Akt	BD	T ²⁰² Y ²⁰⁴ ERK 1/2	CST
Myc (9E10)	ICRF	T ¹⁸² Y ¹⁸⁴ p38	CST
HA (12CA5)	ICRF	S ¹⁵ p53	CST
HA (3F10)	ICRF	p53	CST
EE	ICRF	Y ⁷⁰⁵ STAT3	CST
GST		Y ⁶⁹⁴ STAT5	CST
Rac1	UBI	Y ⁴¹⁰ p130 ^{CAS}	CST
RhoA	SC	p130 ^{CAS}	BD
Cdc42	BD	phospho-SMAD 1/5	CST
PTEN	SC	Vinculine (hvin)	SIGMA
SHIP	SC	cortactine	UBI
p85α (U5)	ICRF	VE-cadhérine	Bender-System

Tableau 18: Anticorps utilisés

II - Les méthodes de précipitations sélectives

A - Les Immunoprécipitations

Cette technique consiste à précipiter une protéine d'intérêt grâce à l'utilisation d'anticorps spécifiques de cette protéine et dont la partie constante est reconnue par la protéine G couplée à des billes de sépharose ^(Amersham). Pour ces expériences, 10.10⁶ à 20.10⁶ cellules sont lysées pendant 30 minutes dans le tampon (TRIS 20 mM (pH 7,5), EDTA 2 mM (pH 8.3), NaCl 150 mM, Brij97 0.5%, NaF 10 mM, Na₃VO₄ 2 mM, PMSF 0.5 mM, leupeptine et pepstatine 5 mg/mL). Après centrifugation du lysat pendant 10 minutes à 14000 rpm, celui-ci est soumis à un pré-clearing avec 20 µl de protéine G-sépharose équilibrée en tampon de lyse (volume à volume) à 4°C pendant 1 heure sur un soleil. A l'issu de cette étape les surnageants sont incubés avec 20 µL de protéine G-sépharose et 5 µg d'anticorps pendant 2 heures à 4°C sur soleil. Après 4 lavages avec le tampon de lyse, les billes sont reprises dans du Laemmli buffer 1X, mises à 95°C pendant 5 minutes et déposée sur gel de polyacrylamide.

B - Les expériences de précipitations sélectives

L'activité des GTPases est évaluée par une technique de précipitation sélective basée sur la reconnaissance des séquences CRIB (pour Rac et Cdc42) (Sander *et al.*, 1999; Moreau *et al.*, 2003) et RBD (pour RhoA) par la forme active des GTPases.

La première étape de cette technique consiste à produire la protéine de fusion GST-CRIB ou GST-RBD et à effectuer le couplage de la GST avec des billes de glutathionne-agarose. Pour cela, on met une colonie de bactérie transformées avec le plasmide pGEX-CRIB (PAK) ou pGEX RBD (rhotékin) dans 50 mL de LB supplémenté avec 100 µg/mL d'ampiciline (SIGMA) en culture à 37°C sur la nuit. Le lendemain, ces 50 mL sont ajoutés à 350 mL de LB sans antibiotique et mis en culture jusqu'à obtention d'une DO₆₀₀ de 0,5-0,6. A ce stade, la synthèse de la protéine de fusion est induite par addition d'IPTG 0,1 mM. L'incubation se fait pendant 1 heure à 37°C. La culture bactérienne est ensuite centrifugée et le culot repris dans un tampon de lyse. Les bactéries sont ensuite sonique 4x30 secondes à 4°C. Après sonication, le lysat bactérien est mis en contact avec les billes de glutathionne-agarose pendant 1h sous agitation à 4°C. Finalement, les billes sont culotées à faible vitesse (500 rpm) et lavées 3 fois avec un grand volume de tampon de lavage, avant d'être resuspendues volume à volume. La quantité, et la qualité des billes sont évaluées par migration sur gel de polyacrylamide et coloration au bleu de Coomassie.

Pour les expériences de pull-down, 10.0^6 à 20.10^6 cellules sont lysées avec un tampon contenant. Une partie du lysat est ensuite incubé avec les billes glutathionne-agarose chargée avec la protéine de fusion GST désirée pendant 2h dans la glace sous agitation. A l'issue de cette incubation les billes sont lavées 3 fois avec un grand volume de tampon de lyse. Les billes sont alors reprises dans du Laemmli buffer 1X, mises à 95°C pendant 5 minutes et déposées sur gel de polyacrylamide, parallèlement au lysat total. L'activité des GTPases est évaluée à partir du ratio entre les bandes détectées en western blot par les anticorps spécifiques anti-Rac, anti-Cdc42 ou Anti-RhoA pour le lysat total et le pull down.

III - Fractionnement Cellulaire

Pour les expériences de fractionnement cellulaire, 10×10^6 cellules DT40 wt ont été déposées soit sur boîtes de culture « classique » (condition adhérente) soit sur boîte de culture bactérienne (condition non adhérente) pendant 3 h en présence de 1,5% de sérum. Les cellules sont ensuite lysées pendant 30 minutes à 4°C à l'aide d'un tampon de lyse hypotonique (Tris (pH 7,5) 10 mM, NaCl 1,5 mM, MgCl₂ 1 mM, DTT 1 mM, Na₃VO₄ 2 mM, PMSF 0,5 mM et leupeptine et pepstatine à 5 mg/mL). Le lysat est homogénéisé à la seringue (aiguilles 23G)

15 fois, puis centrifugé à 14000g pendant 30 min. Le surnageant (fraction cytosolique) est ensuite déposé et migré sur gel SDS-PAGE.

IV - Immunofluorescence

A - Les marquages

Les expériences de localisation cellulaire ont été réalisées par immunofluorescence. Les cellules adhérentes sontensemencées sur des lamelles de verre de 22 mm de diamètre dans du milieu complet. Les lamelles sont rincées dans du PBS puis fixées 10 minutes dans une solution de PFA 3%. Pour les cellules non adhérentes les cellules sont fixées 10 min dans une solution de PFA 3% puis sédimentées sur lamelles recouverte de poly-L-lysine.

Les cellules sont ensuite rincées dans le tampon CB puis perméabilisées 10 minutes en présence de TBS contenant 0,1% Triton X-100. Après trois lavages de 10 minutes dans du TBS, les cellules sont incubées 1 heure dans la solution de blocage (BS). Elles sont ensuite mises en présence du premier anticorps, dilué dans cette même solution pendant 1h. Après trois lavages dans du TBS, les cellules sont incubées 30 min à l'obscurité en présence des anticorps secondaires couplés aux alexa-488 (vert) ou 546 (orange) et le cas échéant de la phalloïdine-alexa 635 (rouge) et du hoechst 33341 (bleu). Les lamelles sont finalement rincées trois fois dans du TBS. Les lamelles sont ensuite montées sur lames avec le milieu de montage Fluoromont[®].

B - Microscopie

Les lames sont analysées en microscopie confocale, sur un système ZEISS LSM510 basé sur un microscope inversé de type Axiovert 200M. Les images sont acquises via le programme propriétaire de ZEISS en utilisant un objectif Plan-Apochromat" 63x (NA : 1,40) Oil DIC M27 (dt=0,19mm). Les différents anticorps secondaires fluorescents utilisés sont couplé soit à l'alexa-488, soit à l'alexa-546. En complément l'Actine est marquée par la phalloïdine-635 et l'ADN par le hoechst 33342. Les images quatre couleurs sont obtenus après excitation par les lasers de longueurs d'onde, 405 nm (bleu, hoechst), 488 nm (vert, alexa-488), 546 nm (orange, alexa-546) et 635 nm (rouge, alexa-635). Le retraitement des images a été effectué à l'aide du logiciel propriétaire de ZEISS (Colocalisation, profile de fluorescence) et de Photoshop[®] CS^(Adobe).

Bibliographie

- Abdel-Latif, D., Steward, M., Macdonald, D.L., Francis, G.A., Dinauer, M.C. & Lacy, P.** (2004) Rac2 is critical for neutrophil primary granule exocytosis. *Blood* **104**(3), 832-9.
- Abe, T., Kato, M., Miki, H., Takenawa, T. & Endo, T.** (2003) Small GTPase Tc10 and its homologue RhoT induce N-WASP-mediated long process formation and neurite outgrowth. *J Cell Sci* **116**(Pt 1), 155-68.
- Adra, C.N., Manor, D., Ko, J.L., Zhu, S., Horiuchi, T., Van Aelst, L., Cerione, R.A. & Lim, B.** (1997) RhoGDI γ : a GDP-dissociation inhibitor for Rho proteins with preferential expression in brain and pancreas. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(9), 4279-84.
- Aghazadeh, B., Lowry, W.E., Huang, X.Y. & Rosen, M.K.** (2000) Structural basis for relief of autoinhibition of the Dbl homology domain of proto-oncogene Vav by tyrosine phosphorylation. *Cell* **102**(5), 625-33.
- Aghazadeh, B., Zhu, K., Kubiseski, T.J., Liu, G.A., Pawson, T., Zheng, Y. & Rosen, M.K.** (1998) Structure and mutagenesis of the Dbl homology domain. *Nat Struct Biol* **5**(12), 1098-107.
- Ahmad, F., Cong, L.N., Stenson Holst, L., Wang, L.M., Rahn Landstrom, T., Pierce, J.H., Quon, M.J., Degerman, E. & Manganiello, V.C.** (2000) Cyclic nucleotide phosphodiesterase 3B is a downstream target of protein kinase B and may be involved in regulation of effects of protein kinase B on thymidine incorporation in FDCP2 cells. *J Immunol* **164**(9), 4678-88.
- Akakura, S., Singh, S., Spataro, M., Akakura, R., Kim, J.I., Albert, M.L. & Birge, R.B.** (2004) The opsonin MFG-E8 is a ligand for the α v β 5 integrin and triggers DOCK180-dependent Rac1 activation for the phagocytosis of apoptotic cells. *Exp Cell Res* **292**(2), 403-16.
- Aktories, K. & Barbieri, J.T.** (2005) Bacterial cytotoxins: targeting eukaryotic switches. *Nat Rev Microbiol* **3**(5), 397-410.
- Aktories, K., Wilde, C. & Vogelsang, M.** (2004) Rho-modifying C3-like ADP-ribosyltransferases. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* **152**, 1-22.
- Al-Khouri, A.M., Ma, Y., Togo, S.H., Williams, S. & Mustelin, T.** (2005) Cooperative phosphorylation of the tumor suppressor phosphatase and tensin homologue (PTEN) by casein kinases and glycogen synthase kinase 3 β . *J Biol Chem* **280**(42), 35195-202.
- Alahari, S.K., Lee, J.W. & Juliano, R.L.** (2000) Nischarin, a novel protein that interacts with the integrin α 5 subunit and inhibits cell migration. *J Cell Biol* **151**(6), 1141-54.
- Albi, E. & Viola Magni, M.P.** (2004) The role of intranuclear lipids. *Biol Cell* **96**(8), 657-67.
- Alderton, W.K., Cooper, C.E. & Knowles, R.G.** (2001) Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *The Biochemical Journal* **357**(Part 3), 593-615.
- Alessi, D.R., Andjelkovic, M., Caudwell, B., Cron, P., Morrice, N., Cohen, P. & Hemmings, B.A.** (1996a) Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1. *Embo J* **15**(23), 6541-51.
- Alessi, D.R., Caudwell, F.B., Andjelkovic, M., Hemmings, B.A. & Cohen, P.** (1996b) Molecular basis for the substrate specificity of protein kinase B; comparison with MAPKAP kinase-1 and p70 S6 kinase. *FEBS Lett* **399**(3), 333-8.
- Alessi, D.R., Deak, M., Casamayor, A., Caudwell, F.B., Morrice, N., Norman, D.G., Gaffney, P., Reese, C.B., MacDougall, C.N., Harbison, D., Ashworth, A. & Downes, M.** (1997a) 3-Phosphoinositide-dependent protein kinase-1 (PDK1): structural and functional homology with the Drosophila DSTPK61 kinase. *Curr Biol* **7**(10), 776-89.
- Alessi, D.R., James, S.R., Downes, C.P., Holmes, A.B., Gaffney, P.R., Reese, C.B. & Cohen, P.** (1997b) Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase B α . *Curr Biol* **7**(4), 261-9.
- Allavena, P., Paganin, C., Martin-Padura, I., Peri, G., Gaboli, M., Dejana, E., Marchisio, P.C. & Mantovani, A.** (1991) Molecules and structures involved in the adhesion of natural killer cells to vascular endothelium. *J Exp Med* **173**(2), 439-48.
- Allsup, D.J. & Cawley, J.C.** (2004) Diagnosis, biology and treatment of hairy-cell leukaemia. *Clin Exp Med* **4**(3), 132-8.
- Altomare, D.A., Lyons, G.E., Mitsuuchi, Y., Cheng, J.Q. & Testa, J.R.** (1998) Akt2 mRNA is highly expressed in embryonic brown fat and the AKT2 kinase is activated by insulin. *Oncogene* **16**(18), 2407-11.
- Altomare, D.A., Tanno, S., De Rienzo, A., Klein-Szanto, A.J., Tanno, S., Skele, K.L., Hoffman, J.P. & Testa, J.R.** (2003) Frequent activation of AKT2 kinase in human pancreatic carcinomas. *J Cell Biochem* **88**(1), 470-6.
- Amano, M., Ito, M., Kimura, K., Fukata, Y., Chihara, K., Nakano, T., Matsuura, Y. & Kaibuchi, K.** (1996) Phosphorylation and activation of myosin by Rho-associated kinase (Rho-kinase). *J Biol Chem* **271**(34), 20246-9.
- Anai, M., Shojima, N., Katagiri, H., Ogihara, T., Sakoda, H., Onishi, Y., Ono, H., Fujishiro, M., Fukushima, Y., Horike, N., Viana, A., Kikuchi, M.,**

- Noguchi, N., Takahashi, S., Takata, K., Oka, Y., Uchijima, Y., Kurihara, H. & Asano, T. (2005) A novel protein kinase B (PKB)/AKT-binding protein enhances PKB kinase activity and regulates DNA synthesis. *J Biol Chem* **280**(18), 18525-35.
- Andjelkovic, M., Jakubowicz, T., Cron, P., Ming, X.F., Han, J.W. & Hemmings, B.A. (1996) Activation and phosphorylation of a pleckstrin homology domain containing protein kinase (RAC-PK/PKB) promoted by serum and protein phosphatase inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(12), 5699-704.
- Angiolillo, A.L., Kanegane, H., Sgadari, C., Reaman, G.H. & Tosato, G. (1997) Interleukin-15 Promotes Angiogenesis in Vivo. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **233**(1), 231-237.
- Anwar, K.N., Fazal, F., Malik, A.B. & Rahman, A. (2004) RhoA/Rho-associated kinase pathway selectively regulates thrombin-induced intercellular adhesion molecule-1 expression in endothelial cells via activation of I kappa B kinase beta and phosphorylation of RelA/p65. *J Immunol* **173**(11), 6965-72.
- Aoudjit, F. & Vuori, K. (2001) Matrix attachment regulates Fas-induced apoptosis in endothelial cells: a role for c-flip and implications for anoikis. *J Cell Biol* **152**(3), 633-43.
- Arcaro, A., Volinia, S., Zvelebil, M.J., Stein, R., Watton, S.J., Layton, M.J., Gout, I., Ahmadi, K., Downward, J. & Waterfield, M.D. (1998) Human phosphoinositide 3-kinase C2beta, the role of calcium and the C2 domain in enzyme activity. *J Biol Chem* **273**(49), 33082-90.
- Arcaro, A. & Wymann, M.P. (1993) Wortmannin is a potent phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor: the role of phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate in neutrophil responses. *Biochem J* **296** (Pt 2), 297-301.
- Arimura, N., Inagaki, N., Chihara, K., Menager, C., Nakamura, N., Amano, M., Iwamatsu, A., Goshima, Y. & Kaibuchi, K. (2000) Phosphorylation of collapsin response mediator protein-2 by Rho-kinase. Evidence for two separate signaling pathways for growth cone collapse. *J Biol Chem* **275**(31), 23973-80.
- Aronheim, A., Broder, Y.C., Cohen, A., Fritsch, A., Belisle, B. & Abo, A. (1998) Chp, a homologue of the GTPase Cdc42Hs, activates the JNK pathway and is implicated in reorganizing the actin cytoskeleton. *Curr Biol* **8**(20), 1125-8.
- Arora, P.D., Ma, J., Min, W., Cruz, T. & McCulloch, C.A. (1995) Interleukin-1-induced calcium flux in human fibroblasts is mediated through focal adhesions. *J Biol Chem* **270**(11), 6042-9.
- Aspenstrom, P., Fransson, A. & Saras, J. (2004) Rho GTPases have diverse effects on the organization of the actin filament system. *Biochem J* **377**(Pt 2), 327-37.
- Astoul, E., Edmunds, C., Cantrell, D.A. & Ward, S.G. (2001) PI 3-K and T-cell activation: limitations of T-leukemic cell lines as signaling models. *Trends Immunol* **22**(9), 490-6.
- Auguin, D., Barthe, P., Royer, C., Stern, M.H., Noguchi, M., Arold, S.T. & Roumestand, C. (2004) Structural basis for the co-activation of protein kinase B by T-cell leukemia-1 (TCL1) family proto-oncoproteins. *J Biol Chem* **279**(34), 35890-902.
- August, A., Sadra, A., Dupont, B. & Hanafusa, H. (1997) Src-induced activation of inducible T cell kinase (ITK) requires phosphatidylinositol 3-kinase activity and the Pleckstrin homology domain of inducible T cell kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(21), 11227-32.
- Aumailley, M. & Gayraud, B. (1998) Structure and biological activity of the extracellular matrix. *J Mol Med* **76**(3-4), 253-65.
- Aznar, S. & Lacal, J.C. (2001) Rho signals to cell growth and apoptosis. *Cancer Lett* **165**(1), 1-10.
- Aznar, S., Valeron, P.F., del Rincon, S.V., Perez, L.F., Perona, R. & Lacal, J.C. (2001) Simultaneous tyrosine and serine phosphorylation of STAT3 transcription factor is involved in Rho A GTPase oncogenic transformation. *Mol Biol Cell* **12**(10), 3282-94.
- Babior, B.M. (2002) The activity of leukocyte NADPH oxidase: regulation by p47PHOX cysteine and serine residues. *Antioxid Redox Signal* **4**(1), 35-8.
- Babior, B.M., Lambeth, J.D. & Nauseef, W. (2002) The neutrophil NADPH oxidase. *Arch Biochem Biophys* **397**(2), 342-4.
- Bae, Y.S., Cantley, L.G., Chen, C.S., Kim, S.R., Kwon, K.S. & Rhee, S.G. (1998) Activation of phospholipase C-gamma by phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate. *J Biol Chem* **273**(8), 4465-9.
- Baird, D., Feng, Q. & Cerione, R.A. (2006) Biochemical characterization of the Cool (Cloned-out-of-Library)/Pix (Pak-interactive exchange factor) proteins. *Methods Enzymol* **406**, 58-69.
- Baker, P.K., Pettitt, A.R., Slupsky, J.R., Chen, H.J., Glenn, M.A., Zuzel, M. & Cawley, J.C. (2002) Response of hairy cells to IFN-alpha involves induction of apoptosis through autocrine TNF-alpha and protection by adhesion. *Blood* **100**(2), 647-53.
- Balendran, A., Biondi, R.M., Cheung, P.C., Casamayor, A., Deak, M. & Alessi, D.R. (2000) A 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 (PDK1) docking site is required for the phosphorylation of protein kinase Czeta (PKCzeta) and PKC-related kinase 2 by PDK1. *J Biol Chem* **275**(27), 20806-13.
- Balendran, A., Casamayor, A., Deak, M., Paterson, A., Gaffney, P., Currie, R., Downes, C.P. & Alessi, D.R. (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.

- Balla, T.** (2005) Inositol-lipid binding motifs: signal integrators through protein-lipid and protein-protein interactions. *J Cell Sci* **118**(Pt 10), 2093-104.
- Bamburg, J.R.** (1999) Proteins of the ADF/cofilin family: essential regulators of actin dynamics. *Annu Rev Cell Dev Biol* **15**, 185-230.
- Banfic, H., Tang, X., Batty, I.H., Downes, C.P., Chen, C. & Rittenhouse, S.E.** (1998) A novel integrin-activated pathway forms PKB/Akt-stimulatory phosphatidylinositol 3,4-bisphosphate via phosphatidylinositol 3-phosphate in platelets. *J Biol Chem* **273**(1), 13-6.
- Bao, W., Thullberg, M., Zhang, H., Onischenko, A. & Stromblad, S.** (2002) Cell attachment to the extracellular matrix induces proteasomal degradation of p21(CIP1) via Cdc42/Rac1 signaling. *Mol Cell Biol* **22**(13), 4587-97.
- Barbieri, M.A., Heath, C.M., Peters, E.M., Wells, A., Davis, J.N. & Stahl, P.D.** (2001) Phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase-1beta is essential for epidermal growth factor receptor-mediated endocytosis. *J Biol Chem* **276**(50), 47212-6.
- Barbour, L.A., Mizanoor Rahman, S., Gurevich, I., Leitner, J.W., Fischer, S.J., Roper, M.D., Knotts, T.A., Vo, Y., McCurdy, C.E., Yakar, S., Leroith, D., Kahn, C.R., Cantley, L.C., Friedman, J.E. & Draznin, B.** (2005) Increased P85alpha is a potent negative regulator of skeletal muscle insulin signaling and induces in vivo insulin resistance associated with growth hormone excess. *J Biol Chem* **280**(45), 37489-94.
- Barnett, S.F., Bilodeau, M.T. & Lindsley, C.W.** (2005) The Akt/PKB family of protein kinases: a review of small molecule inhibitors and progress towards target validation. *Curr Top Med Chem* **5**(2), 109-25.
- Barrett, T., Xiao, B., Dodson, E.J., Dodson, G., Ludbrook, S.B., Nurmahomed, K., Gamblin, S.J., Musacchio, A., Smerdon, S.J. & Eccleston, J.F.** (1997) The structure of the GTPase-activating domain from p50rhoGAP. *Nature* **385**(6615), 458-61.
- Barry, W.T., Boudignon-Proudhon, C., Shock, D.D., McFadden, A., Weiss, J.M., Sondek, J. & Parise, L.V.** (2002) Molecular basis of CIB binding to the integrin alpha IIb cytoplasmic domain. *J Biol Chem* **277**(32), 28877-83.
- Barthwal, M.K., Sathyanarayana, P., Kundu, C.N., Rana, B., Pradeep, A., Sharma, C., Woodgett, J.R. & Rana, A.** (2003) Negative regulation of mixed lineage kinase 3 by protein kinase B/AKT leads to cell survival. *The Journal Of Biological Chemistry* **278**(6), 3897-3902.
- Basso, A.D., Solit, D.B., Chiosis, G., Giri, B., Tsihchlis, P. & Rosen, N.** (2002) Akt forms an intracellular complex with heat shock protein 90 (Hsp90) and Cdc37 and is destabilized by inhibitors of Hsp90 function. *J Biol Chem* **277**(42), 39858-66.
- Basu, S., Totty, N.F., Irwin, M.S., Sudol, M. & Downward, J.** (2003) Akt phosphorylates the Yes-associated protein, YAP, to induce interaction with 14-3-3 and attenuation of p73-mediated apoptosis. *Mol Cell* **11**(1), 11-23.
- Baudhuin, L.M., Cristina, K.L., Lu, J. & Xu, Y.** (2002) Akt activation induced by lysophosphatidic acid and sphingosine-1-phosphate requires both mitogen-activated protein kinase kinase and p38 mitogen-activated protein kinase and is cell-line specific. *Mol Pharmacol* **62**(3), 660-71.
- Baumeister, M.A., Martinu, L., Rossman, K.L., Sondek, J., Lemmon, M.A. & Chou, M.M.** (2003) Loss of phosphatidylinositol 3-phosphate binding by the C-terminal Tiam-1 pleckstrin homology domain prevents in vivo Rac1 activation without affecting membrane targeting. *J Biol Chem* **278**(13), 11457-64.
- Beeton, C.A., Chance, E.M., Foukas, L.C. & Shepherd, P.R.** (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.
- Bellacosa, A., Chan, T.O., Ahmed, N.N., Datta, K., Malstrom, S., Stokoe, D., McCormick, F., Feng, J. & Tsihchlis, P.** (1998) Akt activation by growth factors is a multiple-step process: the role of the PH domain. *Oncogene* **17**(3), 313-25.
- Bellacosa, A., de Feo, D., Godwin, A.K., Bell, D.W., Cheng, J.Q., Altomare, D.A., Wan, M., Dubeau, L., Scambia, G., Masciullo, V. & et al.** (1995) Molecular alterations of the AKT2 oncogene in ovarian and breast carcinomas. *Int J Cancer* **64**(4), 280-5.
- Bellacosa, A., Franke, T.F., Gonzalez-Portal, M.E., Datta, K., Taguchi, T., Gardner, J., Cheng, J.Q., Testa, J.R. & Tsihchlis, P.N.** (1993) Structure, expression and chromosomal mapping of c-akt: relationship to v-akt and its implications. *Oncogene* **8**(3), 745-54.
- Bellacosa, A., Kumar, C.C., Di Cristofano, A. & Testa, J.R.** (2005) Activation of AKT kinases in cancer: implications for therapeutic targeting. *Adv Cancer Res* **94**, 29-86.
- Bellacosa, A., Testa, J.R., Staal, S.P. & Tsihchlis, P.N.** (1991) A retroviral oncogene, akt, encoding a serine-threonine kinase containing an SH2-like region. *Science* **254**(5029), 274-7.
- Bellanger, J.M., Astier, C., Sardet, C., Ohta, Y., Stossel, T.P. & Debant, A.** (2000) The Rac1- and RhoG-specific GEF domain of Trio targets filamin to remodel cytoskeletal actin. *Nat Cell Biol* **2**(12), 888-92.
- Beltran, P.J. & Bixby, J.L.** (2003) Receptor protein tyrosine phosphatases as mediators of cellular adhesion. *Front Biosci* **8**, d87-99.

- Benitah, S.A., Valeron, P.F., Rui, H. & Lacal, J.C.** (2003) STAT5a activation mediates the epithelial to mesenchymal transition induced by oncogenic RhoA. *Mol Biol Cell* **14**(1), 40-53.
- Berman, E., Heller, G., Kempin, S., Gee, T., Tran, L.L. & Clarkson, B.** (1990) Incidence of response and long-term follow-up in patients with hairy cell leukemia treated with recombinant interferon alfa-2a. *Blood* **75**(4), 839-45.
- Bernards, A. & Settleman, J.** (2004) GAP control: regulating the regulators of small GTPases. *Trends Cell Biol* **14**(7), 377-85.
- Bernstein, L., Newton, P. & Ross, R.K.** (1990) Epidemiology of hairy cell leukemia in Los Angeles County. *Cancer Res* **50**(12), 3605-9.
- Berridge, M.J.** (1984) Inositol trisphosphate and diacylglycerol as second messengers. *Biochem J* **220**(2), 345-60.
- Berridge, M.J.** (1989) Inositol 1,4,5-trisphosphate-induced calcium mobilization is localized in *Xenopus* oocytes. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* **238**(1292), 235-43.
- Berwick, D.C., Dell, G.C., Welsh, G.I., Heesom, K.J., Hers, I., Fletcher, L.M., Cooke, F.T. & Tavaré, J.M.** (2004) Protein kinase B phosphorylation of PIKfyve regulates the trafficking of GLUT4 vesicles. *J Cell Sci* **117**(Pt 25), 5985-93.
- Beutler, E.** (1992) Cladribine (2-chlorodeoxyadenosine). *Lancet* **340**(8825), 952-6.
- Bi, L., Okabe, I., Bernard, D.J. & Nussbaum, R.L.** (2002) Early embryonic lethality in mice deficient in the p110beta catalytic subunit of PI 3-kinase. *Mamm Genome* **13**(3), 169-72.
- Bi, L., Okabe, I., Bernard, D.J., Wynshaw-Boris, A. & Nussbaum, R.L.** (1999) Proliferative defect and embryonic lethality in mice homozygous for a deletion in the p110alpha subunit of phosphoinositide 3-kinase. *J Biol Chem* **274**(16), 10963-8.
- Biffo, S., Sanvito, F., Costa, S., Preve, L., Pignatelli, R., Spinardi, L. & Marchisio, P.C.** (1997) Isolation of a novel beta4 integrin-binding protein (p27(BBP)) highly expressed in epithelial cells. *J Biol Chem* **272**(48), 30314-21.
- Biggs, W.H., 3rd, Meisenhelder, J., Hunter, T., Cavenee, W.K. & Arden, K.C.** (1999) Protein kinase B/Akt-mediated phosphorylation promotes nuclear exclusion of the winged helix transcription factor FKHR1. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America* **96**(13), 7421-7426.
- Biondi, R.M.** (2004) Phosphoinositide-dependent protein kinase 1, a sensor of protein conformation. *Trends Biochem Sci* **29**(3), 136-42.
- Bishop, A.L. & Hall, A.** (2000) Rho GTPases and their effector proteins. *Biochem J* **348** Pt 2, 241-55.
- Blomberg, N., Baraldi, E., Nilges, M. & Saraste, M.** (1999) The PH superfold: a structural scaffold for multiple functions. *Trends Biochem Sci* **24**(11), 441-5.
- Bokoch, G.M., Vlahos, C.J., Wang, Y., Knaus, U.G. & Traynor-Kaplan, A.E.** (1996) Rac GTPase interacts specifically with phosphatidylinositol 3-kinase. *Biochem J* **315** (Pt 3), 775-9.
- Bonfoco, E., Chen, W., Paul, R., Cheresch, D.A. & Cooper, N.R.** (2000) beta1 integrin antagonism on adherent, differentiated human neuroblastoma cells triggers an apoptotic signaling pathway. *Neuroscience* **101**(4), 1145-52.
- Borthwick, E.B., Korobko, I.V., Luke, C., Drel, V.R., Fedyshyn, Y.Y., Ninkina, N., Drobot, L.B. & Buchman, V.L.** (2004) Multiple domains of Ruk/CIN85/SETA/CD2BP3 are involved in interaction with p85alpha regulatory subunit of PI 3-kinase. *J Mol Biol* **343**(4), 1135-46.
- Botelho, R.J., Teruel, M., Dierckman, R., Anderson, R., Wells, A., York, J.D., Meyer, T. & Grinstein, S.** (2000) Localized biphasic changes in phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate at sites of phagocytosis. *J Cell Biol* **151**(7), 1353-68.
- Boudreau, N., Sympson, C.J., Werb, Z. & Bissell, M.J.** (1995) Suppression of ICE and apoptosis in mammary epithelial cells by extracellular matrix. *Science* **267**(5199), 891-3.
- Bourmeyster, N. & Vignais, P.V.** (1996) Phosphorylation of Rho GDI stabilizes the Rho A-Rho GDI complex in neutrophil cytosol. *Biochem Biophys Res Commun* **218**(1), 54-60.
- Bourne, H.R., Sanders, D.A. & McCormick, F.** (1991) The GTPase superfamily: conserved structure and molecular mechanism. *Nature* **349**(6305), 117-27.
- Bouroncle, B.A., Wiseman, B.K. & Doan, C.A.** (1958) Leukemic reticuloendotheliosis. *Blood* **13**(7), 609-30.
- Bouvard, D., Vignoud, L., Dupe-Manet, S., Abed, N., Fournier, H.N., Vincent-Monegat, C., Retta, S.F., Fassler, R. & Block, M.R.** (2003) Disruption of focal adhesions by integrin cytoplasmic domain-associated protein-1 alpha. *J Biol Chem* **278**(8), 6567-74.
- Brancaccio, M., Guazzone, S., Menini, N., Sibona, E., Hirsch, E., De Andrea, M., Rocchi, M., Altruda, F., Tarone, G. & Silengo, L.** (1999) Melusin is a new muscle-specific interactor for beta(1) integrin cytoplasmic domain. *J Biol Chem* **274**(41), 29282-8.
- Brauweiler, A., Tamir, I., Dal Porto, J., Benschop, R.J., Helgason, C.D., Humphries, R.K., Freed, J.H. & Cambier, J.C.** (2000) Differential regulation of B cell development, activation, and death by the src homology 2 domain-containing 5' inositol phosphatase (SHIP). *J Exp Med* **191**(9), 1545-54.
- Brazil, D.P. & Hemmings, B.A.** (2001) Ten years of protein kinase B signalling: a hard Akt to follow. *Trends Biochem Sci* **26**(11), 657-64.

- Breitenlechner, C.B., Friebe, W.G., Brunet, E., Werner, G., Graul, K., Thomas, U., Kunkele, K.P., Schafer, W., Gassel, M., Bossemeyer, D., Huber, R., Engh, R.A. & Masjost, B.** (2005) Design and crystal structures of protein kinase B-selective inhibitors in complex with protein kinase A and mutants. *J Med Chem* **48**(1), 163-70.
- Breitschopf, K., Zeiher, A.M. & Dimmeler, S.** (2001) Pro-atherogenic factors induce telomerase inactivation in endothelial cells through an Akt-dependent mechanism. *FEBS Letters* **493**(1), 21-25.
- Brenner, B., Koppenhoefer, U., Weinstock, C., Linderkamp, O., Lang, F. & Gulbins, E.** (1997) Fas- or ceramide-induced apoptosis is mediated by a Rac1-regulated activation of Jun N-terminal kinase/p38 kinases and GADD153. *J Biol Chem* **272**(35), 22173-81.
- Brodbeck, D., Hill, M.M. & Hemmings, B.A.** (2001) Two splice variants of protein kinase B gamma have different regulatory capacity depending on the presence or absence of the regulatory phosphorylation site serine 472 in the carboxyl-terminal hydrophobic domain. *J Biol Chem* **276**(31), 29550-8.
- Brugnera, E., Haney, L., Grimsley, C., Lu, M., Walk, S.F., Tosello-Trampont, A.C., Macara, I.G., Madhani, H., Fink, G.R. & Ravichandran, K.S.** (2002) Unconventional Rac-GEF activity is mediated through the Dock180-ELMO complex. *Nat Cell Biol* **4**(8), 574-82.
- Bruhns, P., Vely, F., Malbec, O., Fridman, W.H., Vivier, E. & Daeron, M.** (2000) Molecular basis of the recruitment of the SH2 domain-containing inositol 5-phosphatases SHIP1 and SHIP2 by fcgamma RIIB. *J Biol Chem* **275**(48), 37357-64.
- Brunet, A., Bonni, A., Zigmond, M.J., Lin, M.Z., Juo, P., Hu, L.S., Anderson, M.J., Arden, K.C., Blenis, J. & Greenberg, M.E.** (1999) Akt Promotes Cell Survival by Phosphorylating and Inhibiting a Forkhead Transcription Factor. *Cell* **96**(6), 857-868.
- Bruss, M.D., Arias, E.B., Lienhard, G.E. & Cartee, G.D.** (2005) Increased phosphorylation of Akt substrate of 160 kDa (AS160) in rat skeletal muscle in response to insulin or contractile activity. *Diabetes* **54**(1), 41-50.
- Buccione, R., Orth, J.D. & McNiven, M.A.** (2004) Foot and mouth: podosomes, invadopodia and circular dorsal ruffles. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**(8), 647-57.
- Buchanan, F.G., Elliot, C.M., Gibbs, M. & Exton, J.H.** (2000) Translocation of the Rac1 guanine nucleotide exchange factor Tiam1 induced by platelet-derived growth factor and lysophosphatidic acid. *J Biol Chem* **275**(13), 9742-8.
- Burbelo, P.D., Drechsel, D. & Hall, A.** (1995) A conserved binding motif defines numerous candidate target proteins for both Cdc42 and Rac GTPases. *J Biol Chem* **270**(49), 29071-4.
- Burd, C.G. & Emr, S.D.** (1998) Phosphatidylinositol(3)-phosphate signaling mediated by specific binding to RING FYVE domains. *Mol Cell* **2**(1), 157-62.
- Burgering, B.M.T. & Medema, R.H.** (2003) Decisions on life and death: FOXO Forkhead transcription factors are in command when PKB/Akt is off duty. *Journal Of Leukocyte Biology* **73**(6), 689-701.
- Burns, G.F., Cawley, J.C., Worman, C.P., Karpas, A., Barker, C.R., Goldstone, A.H. & Hayhoe, F.G.** (1978) Multiple heavy chain isotypes on the surface of the cells of hairy cell leukemia. *Blood* **52**(6), 1132-47.
- Burns, S., Thrasher, A.J., Blundell, M.P., Machesky, L. & Jones, G.E.** (2001) Configuration of human dendritic cell cytoskeleton by Rho GTPases, the WAS protein, and differentiation. *Blood* **98**(4), 1142-9.
- Burthem, J., Zuzel, M. & Cawley, J.C.** (1997) What is the nature of the hairy cell and why should we be interested? *Br J Haematol* **97**(3), 511-4.
- Burton, J.D., Bamford, R.N., Peters, C., Grant, A.J., Kurys, G., Goldman, C.K., Brennan, J., Roessler, E. & Waldmann, T.A.** (1994) A lymphokine, provisionally designated interleukin T and produced by a human adult T-cell leukemia line, stimulates T-cell proliferation and the induction of lymphokine-activated killer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(11), 4935-9.
- Bustelo, X.R.** (2000) Regulatory and signaling properties of the Vav family. *Mol Cell Biol* **20**(5), 1461-77.
- Bustelo, X.R.** (2001) Vav proteins, adaptors and cell signaling. *Oncogene* **20**(44), 6372-81.
- Butler, M.G., Dasouki, M.J., Zhou, X.P., Talebizadeh, Z., Brown, M., Takahashi, T.N., Miles, J.H., Wang, C.H., Stratton, R., Pilarski, R. & Eng, C.** (2005) Subset of individuals with autism spectrum disorders and extreme macrocephaly associated with germline PTEN tumour suppressor gene mutations. *J Med Genet* **42**(4), 318-21.
- Cai, S., Bulus, N., Fonseca-Siesser, P.M., Chen, D., Hanks, S.K., Pozzi, A. & Zent, R.** (2005) CD98 modulates integrin beta1 function in polarized epithelial cells. *J Cell Sci* **118**(Pt 5), 889-99.
- Cai, S.L., Tee, A.R., Short, J.D., Bergeron, J.M., Kim, J., Shen, J., Guo, R., Johnson, C.L., Kiguchi, K. & Walker, C.L.** (2006) Activity of TSC2 is inhibited by AKT-mediated phosphorylation and membrane partitioning. *J Cell Biol* **173**(2), 279-89.
- Caligaris-Cappio, F., Bergui, L., Tesio, L., Corbascio, G., Tousco, F. & Marchisio, P.C.** (1986) Cytoskeleton organization is aberrantly rearranged in the cells of B chronic lymphocytic leukemia and hairy cell leukemia. *Blood* **67**(1), 233-9.
- Cantley, L.C. & Neel, B.G.** (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.
- Capello, D., Vitolo, U., Pasqualucci, L., Quattrone, S., Migliaretti, G., Fassone, L., Ariatti, C., Vivenza, D., Gloghini, A., Pastore, C., Lanza, C., Nomdedeu, J., Botto, B., Freilone, R., Buonaiuto, D., Zagonel, V., Gallo, E., Palestro, G., Saglio, G., Dalla-Favera, R., Carbone, A. & Gaidano, G.** (2000) Distribution and pattern of BCL-6 mutations throughout the spectrum of B-cell neoplasia. *Blood* **95**(2), 651-9.
- Cardone, M.H., Roy, N., Stennicke, H.R., Salvesen, G.S., Franke, T.F., Stanbridge, E., Frisch, S. & Reed, J.C.** (1998) Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation. *Science* **282**(5392), 1318-1321.
- Carlos, T.M. & Harlan, J.M.** (1994) Leukocyte-endothelial adhesion molecules. *Blood* **84**(7), 2068-101.
- Caron, E. & Hall, A.** (1998) Identification of two distinct mechanisms of phagocytosis controlled by different Rho GTPases. *Science* **282**(5394), 1717-21.
- Carpenter, C.L., Auger, K.R., Chanudhuri, M., Yoakim, M., Schaffhausen, B., Shoelson, S. & Cantley, L.C.** (1993) Phosphoinositide 3-kinase is activated by phosphopeptides that bind to the SH2 domains of the 85-kDa subunit. *The Journal Of Biological Chemistry* **268**(13), 9478-9483.
- Carstensen, D., Yamauchi, A., Koornneef, A., Zang, H., Filippi, M.D., Harris, C., Towe, J., Atkinson, S., Zheng, Y., Dinauer, M.C. & Williams, D.A.** (2005) Rac2 regulates neutrophil chemotaxis, superoxide production, and myeloid colony formation through multiple distinct effector pathways. *J Immunol* **174**(8), 4613-20.
- Carver, D.J., Aman, M.J. & Ravichandran, K.S.** (2000) SHIP inhibits Akt activation in B cells through regulation of Akt membrane localization. *Blood* **96**(4), 1449-56.
- Casamayor, A., Torrance, P.D., Kobayashi, T., Thorner, J. & Alessi, D.R.** (1999) Functional counterparts of mammalian protein kinases PDK1 and SGK in budding yeast. *Curr Biol* **9**(4), 186-97.
- Cassileth, P.A., Chevart, B., Spiers, A.S., Harrington, D.P., Cummings, F.J., Neiman, R.S., Bennett, J.M. & O'Connell, M.J.** (1991) Pentostatin induces durable remissions in hairy cell leukemia. *J Clin Oncol* **9**(2), 243-6.
- Cassimeris, L.** (2002) The oncoprotein 18/stathmin family of microtubule destabilizers. *Curr Opin Cell Biol* **14**(1), 18-24.
- Castellano, F., Le Clairche, C., Patin, D., Carlier, M.F. & Chavrier, P.** (2001) A WASp-VASP complex regulates actin polymerization at the plasma membrane. *Embo J* **20**(20), 5603-14.
- Castillo, S.S., Brognard, J., Petukhov, P.A., Zhang, C., Tsurutani, J., Granville, C.A., Li, M., Jung, M., West, K.A., Gills, J.G., Kozikowski, A.P. & Dennis, P.A.** (2004) Preferential inhibition of Akt and killing of Akt-dependent cancer cells by rationally designed phosphatidylinositol ether lipid analogues. *Cancer Res* **64**(8), 2782-92.
- Cau, J. & Hall, A.** (2005) Cdc42 controls the polarity of the actin and microtubule cytoskeletons through two distinct signal transduction pathways. *J Cell Sci* **118**(Pt 12), 2579-87.
- Cerione, R.A. & Zheng, Y.** (1996) The Dbl family of oncogenes. *Curr Opin Cell Biol* **8**(2), 216-22.
- Chaigne-Delalande, B., Deuve, L., Reuzeau, E., Basoni, C., Lafarge, D., Varon, C., Tatin, F., Anies, G., Garand, R., Kramer, I. & Genot, E.** (2006) RhoGTPases and p53 are involved in the morphological appearance and interferon-alpha response of hairy cells. *Am J Pathol* **168**(2), 562-73.
- Chamberlain, M.D., Berry, T.R., Pastor, M.C. & Anderson, D.H.** (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.
- Chan, T.O., Rittenhouse, S.E. & Tsichlis, P.N.** (1999) AKT/PKB and other D3 phosphoinositide-regulated kinases: kinase activation by phosphoinositide-dependent phosphorylation. *Annu Rev Biochem* **68**, 965-1014.
- Chan, T.O. & Tsichlis, P.N.** (2001) PDK2: a complex tail in one Akt. *Sci STKE* **2001**(66), PE1.
- Chardin, P.** (2006) Function and regulation of Rnd proteins. *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**(1), 54-62.
- Chaves-Olarte, E., Low, P., Freer, E., Norlin, T., Weidmann, M., von Eichel-Streiber, C. & Thelestam, M.** (1999) A novel cytotoxin from *Clostridium difficile* serogroup F is a functional hybrid between two other large clostridial cytotoxins. *J Biol Chem* **274**(16), 11046-52.
- Chavez, J.A., Gridley, S., Sano, H., Lane, W.S. & Lienhard, G.E.** (2006) The 47kDa Akt substrate associates with phosphodiesterase 3B and regulates its level in adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun* **342**(4), 1218-22.
- Chellaiah, M.A., Biswas, R.S., Yuen, D., Alvarez, U.M. & Hruska, K.A.** (2001) Phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate directs association of Src homology 2-containing signaling proteins with gelsolin. *J Biol Chem* **276**(50), 47434-44.
- Chellaiah, M.A., Soga, N., Swanson, S., McAllister, S., Alvarez, U., Wang, D., Dowdy, S.F. & Hruska, K.A.** (2000) Rho-A is critical for osteoclast podosome organization, motility, and bone resorption. *J Biol Chem* **275**(16), 11993-2002.
- Chen, H.C., Appeddu, P.A., Parsons, J.T., Hildebrand, J.D., Schaller, M.D. & Guan, J.L.** (1995) Interaction of focal adhesion kinase with cytoskeletal protein talin. *J Biol Chem* **270**(28), 16995-9.

- Chen, Q., Powell, D.W., Rane, M.J., Singh, S., Butt, W., Klein, J.B. & McLeish, K.R.** (2003) Akt phosphorylates p47phox and mediates respiratory burst activity in human neutrophils. *Journal Of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* **170**(10), 5302-5308.
- Chen, R., Kim, O., Yang, J., Sato, K., Eisenmann, K.M., McCarthy, J., Chen, H. & Qiu, Y.** (2001a) Regulation of Akt/PKB activation by tyrosine phosphorylation. *J Biol Chem* **276**(34), 31858-62.
- Chen, W.S., Xu, P.Z., Gottlob, K., Chen, M.L., Sokol, K., Shiyanova, T., Roninson, I., Weng, W., Suzuki, R., Tobe, K., Kadowaki, T. & Hay, N.** (2001b) Growth retardation and increased apoptosis in mice with homozygous disruption of the Akt1 gene. *Genes Dev* **15**(17), 2203-8.
- Chen, Y.M., Wang, Q.J., Hu, H.S., Yu, P.C., Zhu, J., Drewes, G., Piwnica-Worms, H. & Luo, Z.G.** (2006) Microtubule affinity-regulating kinase 2 functions downstream of the PAR-3/PAR-6/atypical PKC complex in regulating hippocampal neuronal polarity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(22), 8534-9.
- Chen, Z. & Cobb, M.H.** (2006) Activation of MEKK1 by Rho GTPases. *Methods Enzymol* **406**, 468-78.
- Chen, Z., Sun, J., Pradines, A., Favre, G., Adnane, J. & Sebti, S.M.** (2000) Both farnesylated and geranylgeranylated RhoB inhibit malignant transformation and suppress human tumor growth in nude mice. *J Biol Chem* **275**(24), 17974-8.
- Chenette, E.J., Mitin, N.Y. & Der, C.J.** (2006) Multiple Sequence Elements Facilitate Chp Rho GTPase Subcellular Location, Membrane Association, and Transforming Activity. *Mol Biol Cell*.
- Cheng, L., Rossman, K.L., Mahon, G.M., Worthylake, D.K., Korus, M., Sondek, J. & Whitehead, I.P.** (2002) RhoGEF specificity mutants implicate RhoA as a target for Dbs transforming activity. *Mol Cell Biol* **22**(19), 6895-905.
- Cheng, T.L., Symons, M. & Jou, T.S.** (2004) Regulation of anoikis by Cdc42 and Rac1. *Exp Cell Res* **295**(2), 497-511.
- Cheng, X., Ma, Y., Moore, M., Hemmings, B.A. & Taylor, S.S.** (1998) Phosphorylation and activation of cAMP-dependent protein kinase by phosphoinositide-dependent protein kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(17), 9849-54.
- Chishti, A.H., Kim, A.C., Marfatia, S.M., Lutchman, M., Hanspal, M., Jindal, H., Liu, S.C., Low, P.S., Rouleau, G.A., Mohandas, N., Chasis, J.A., Conboy, J.G., Gascard, P., Takakuwa, Y., Huang, S.C., Benz, E.J., Jr., Bretscher, A., Fehon, R.G., Gusella, J.F., Ramesh, V., Solomon, F., Marchesi, V.T., Tsukita, S., Tsukita, S., Hoover, K.B. & et al.** (1998) The FERM domain: a unique module involved in the linkage of cytoplasmic proteins to the membrane. *Trends Biochem Sci* **23**(8), 281-2.
- Cho, H., Mu, J., Kim, J.K., Thorvaldsen, J.L., Chu, Q., Crenshaw, E.B., 3rd, Kaestner, K.H., Bartolomei, M.S., Shulman, G.I. & Birnbaum, M.J.** (2001a) Insulin resistance and a diabetes mellitus-like syndrome in mice lacking the protein kinase Akt2 (PKB beta). *Science* **292**(5522), 1728-31.
- Cho, H., Thorvaldsen, J.L., Chu, Q., Feng, F. & Birnbaum, M.J.** (2001b) Akt1/PKBalpha is required for normal growth but dispensable for maintenance of glucose homeostasis in mice. *J Biol Chem* **276**(42), 38349-52.
- Chou, M.M., Masuda-Robens, J.M. & Gupta, M.L.** (2003) Cdc42 promotes G1 progression through p70 S6 kinase-mediated induction of cyclin E expression. *J Biol Chem* **278**(37), 35241-7.
- Chuang, T.H., Bohl, B.P. & Bokoch, G.M.** (1993) Biologically active lipids are regulators of Rac.GDI complexation. *J Biol Chem* **268**(35), 26206-11.
- Chuang, T.H., Xu, X., Kaartinen, V., Heisterkamp, N., Groffen, J. & Bokoch, G.M.** (1995) Abr and Bcr are multifunctional regulators of the Rho GTP-binding protein family. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(22), 10282-6.
- Chung, C.Y., Potikyan, G. & Firtel, R.A.** (2001) Control of cell polarity and chemotaxis by Akt/PKB and PI3 kinase through the regulation of PAKa. *Mol Cell* **7**(5), 937-47.
- Clark, E.A., Golub, T.R., Lander, E.S. & Hynes, R.O.** (2000) Genomic analysis of metastasis reveals an essential role for RhoC. *Nature* **406**(6795), 532-5.
- Clarke, S.** (1992) Protein isoprenylation and methylation at carboxyl-terminal cysteine residues. *Annu Rev Biochem* **61**, 355-86.
- Coffer, P.J. & Woodgett, J.R.** (1991) Molecular cloning and characterisation of a novel putative protein-serine kinase related to the cAMP-dependent and protein kinase C families. *Eur J Biochem* **201**(2), 475-81.
- Coleman, M.L., Densham, R.M., Croft, D.R. & Olson, M.F.** (2006) Stability of p21Waf1/Cip1 CDK inhibitor protein is responsive to RhoA-mediated regulation of the actin cytoskeleton. *Oncogene* **25**(19), 2708-16.
- Colgin, L.M. & Reddel, R.R.** (1999) Telomere maintenance mechanisms and cellular immortalization. *Current Opinion in Genetics & Development* **9**(1), 97-103.
- Collard, J.G., Habets, G.G., Michiels, F., Stam, J., van der Kammen, R.A. & van Leeuwen, F.** (1996) Role of Tiam 1 in Rac-mediated signal transduction pathways. *Curr Top Microbiol Immunol* **213** (Pt 2), 253-65.
- Coniglio, S.J., Jou, T.S. & Symons, M.** (2001) Rac1 protects epithelial cells against anoikis. *J Biol Chem* **276**(30), 28113-20.

- Conus, N.M., Hannan, K.M., Cristiano, B.E., Hemmings, B.A. & Pearson, R.B.** (2002) Direct identification of tyrosine 474 as a regulatory phosphorylation site for the Akt protein kinase. *J Biol Chem* **277**(41), 38021-8.
- Cooke, F.T., Dove, S.K., McEwen, R.K., Painter, G., Holmes, A.B., Hall, M.N., Michell, R.H. & Parker, P.J.** (1998) The stress-activated phosphatidylinositol 3-phosphate 5-kinase Fab1p is essential for vacuole function in *S. cerevisiae*. *Curr Biol* **8**(22), 1219-22.
- Coppolino, M.G., Woodside, M.J., Demaux, N., Grinstein, S., St-Arnaud, R. & Dedhar, S.** (1997) Calreticulin is essential for integrin-mediated calcium signalling and cell adhesion. *Nature* **386**(6627), 843-7.
- Cornfield, D.B., Mitchell Nelson, D.M., Rimsza, L.M., Moller-Patti, D. & Braylan, R.C.** (2001) The diagnosis of hairy cell leukemia can be established by flow cytometric analysis of peripheral blood, even in patients with low levels of circulating malignant cells. *Am J Hematol* **67**(4), 223-6.
- Costello, P.S., Cleverley, S.C., Galandrini, R., Henning, S.W. & Cantrell, D.A.** (2000) The GTPase rho controls a p53-dependent survival checkpoint during thymopoiesis. *J Exp Med* **192**(1), 77-85.
- Cote, J.F., Motoyama, A.B., Bush, J.A. & Vuori, K.** (2005) A novel and evolutionarily conserved PtdIns(3,4,5)P₃-binding domain is necessary for DOCK180 signalling. *Nat Cell Biol* **7**(8), 797-807.
- Cote, J.F. & Vuori, K.** (2002) Identification of an evolutionarily conserved superfamily of DOCK180-related proteins with guanine nucleotide exchange activity. *J Cell Sci* **115**(Pt 24), 4901-13.
- Cozier, G.E., Carlton, J., Bouyoucef, D. & Cullen, P.J.** (2004) Membrane targeting by pleckstrin homology domains. *Curr Top Microbiol Immunol* **282**, 49-88.
- Crespo, P., Schuebel, K.E., Ostrom, A.A., Gutkind, J.S. & Bustelo, X.R.** (1997) Phosphotyrosine-dependent activation of Rac-1 GDP/GTP exchange by the vav proto-oncogene product. *Nature* **385**(6612), 169-72.
- Crompton, A.M., Foley, L.H., Wood, A., Roscoe, W., Stokoe, D., McCormick, F., Symons, M. & Bollag, G.** (2000) Regulation of Tiam1 nucleotide exchange activity by pleckstrin domain binding ligands. *J Biol Chem* **275**(33), 25751-9.
- Cross, D.A., Alessi, D.R., Cohen, P., Andjelkovich, M. & Hemmings, B.A.** (1995) Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature* **378**(6559), 785-9.
- Crozier, S.J., Zhang, X., Wang, J., Cheung, J., Kimball, S.R. & Jefferson, L.S.** (2006) Activation of Signaling Pathways and Regulatory Mechanisms of mRNA Translation Following Myocardial Ischemia/Reperfusion. *J Appl Physiol*.
- Cuevas, B., Lu, Y., Watt, S., Kumar, R., Zhang, J., Siminovitch, K.A. & Mills, G.B.** (1999) SHP-1 regulates Lck-induced phosphatidylinositol 3-kinase phosphorylation and activity. *J Biol Chem* **274**(39), 27583-9.
- Cuevas, B.D., Lu, Y., Mao, M., Zhang, J., LaPushin, R., Siminovitch, K. & Mills, G.B.** (2001) Tyrosine phosphorylation of p85 relieves its inhibitory activity on phosphatidylinositol 3-kinase. *J Biol Chem* **276**(29), 27455-61.
- Currie, R.A., Walker, K.S., Gray, A., Deak, M., Casamayor, A., Downes, C.P., Cohen, P., Alessi, D.R. & Lucocq, J.** (1999) Role of phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate in regulating the activity and localization of 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1. *Biochem J* **337** (Pt 3), 575-83.
- DaCosta Byfield, S., Major, C., Laping, N.J. & Roberts, A.B.** (2004) SB-505124 is a selective inhibitor of transforming growth factor-beta type I receptors ALK4, ALK5, and ALK7. *Mol Pharmacol* **65**(3), 744-52.
- Damen, J.E., Liu, L., Cutler, R.L. & Krystal, G.** (1993) Erythropoietin stimulates the tyrosine phosphorylation of Shc and its association with Grb2 and a 145-Kd tyrosine phosphorylated protein. *Blood* **82**(8), 2296-303.
- Damen, J.E., Liu, L., Rosten, P., Humphries, R.K., Jefferson, A.B., Majerus, P.W. & Krystal, G.** (1996) The 145-kDa protein induced to associate with Shc by multiple cytokines is an inositol tetrakisphosphate and phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate 5-phosphatase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(4), 1689-93.
- Damen, J.E., Liu, L., Ware, M.D., Ermolaeva, M., Majerus, P.W. & Krystal, G.** (1998) Multiple forms of the SH2-containing inositol phosphatase, SHIP, are generated by C-terminal truncation. *Blood* **92**(4), 1199-205.
- Dan, H.C., Sun, M., Kaneko, S., Feldman, R.I., Nicosia, S.V., Wang, H.G., Tsang, B.K. & Cheng, J.Q.** (2004) Akt phosphorylation and stabilization of X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP). *J Biol Chem* **279**(7), 5405-12.
- Das, B., Shu, X., Day, G.J., Han, J., Krishna, U.M., Falck, J.R. & Broek, D.** (2000) Control of intramolecular interactions between the pleckstrin homology and Dbl homology domains of Vav and Sos1 regulates Rac binding. *J Biol Chem* **275**(20), 15074-81.
- Das, S., Dixon, J.E. & Cho, W.** (2003) Membrane-binding and activation mechanism of PTEN. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(13), 7491-6.
- Datta, S.R., Brunet, A. & Greenberg, M.E.** (1999) Cellular survival: a play in three acts. *Genes Dev* **13**(22), 2905-27.

- Datta, S.R., Dudek, H., Tao, X., Masters, S., Fu, H., Gotoh, Y. & Greenberg, M.E.** (1997) Akt Phosphorylation of BAD Couples Survival Signals to the Cell-Intrinsic Death Machinery. *Cell* **91**(2), 231-241.
- David-Pfeuty, T. & Singer, S.J.** (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.
- Davies, S.P., Reddy, H., Caivano, M. & Cohen, P.** (2000) Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors. *Biochem J* **351**(Pt 1), 95-105.
- De Camilli, P., Chen, H., Hyman, J., Panepucci, E., Bateman, A. & Brunger, A.T.** (2002) The ENTH domain. *FEBS Lett* **513**(1), 11-8.
- Deane, J.A., Trifilo, M.J., Yballe, C.M., Choi, S., Lane, T.E. & Fruman, D.A.** (2004) Enhanced T cell proliferation in mice lacking the p85beta subunit of phosphoinositide 3-kinase. *J Immunol* **172**(11), 6615-25.
- Dearden, C.E., Matutes, E., Hilditch, B.L., Swansbury, G.J. & Catovsky, D.** (1999) Long-term follow-up of patients with hairy cell leukaemia after treatment with pentostatin or cladribine. *Br J Haematol* **106**(2), 515-9.
- Degani, S., Balzac, F., Brancaccio, M., Guazzone, S., Retta, S.F., Silengo, L., Eva, A. & Tarone, G.** (2002) The integrin cytoplasmic domain-associated protein ICAP-1 binds and regulates Rho family GTPases during cell spreading. *J Cell Biol* **156**(2), 377-87.
- Degtarev, A., Boyce, M. & Yuan, J.** (2003) A decade of caspases. *Oncogene* **22**(53), 8543-67.
- del Peso, L., Gonzalez-Garcia, M., Page, C., Herrera, R. & Nunez, G.** (1997) Interleukin-3-induced phosphorylation of BAD through the protein kinase Akt. *Science* **278**(5338), 687-9.
- del Pozo, M.A., Alderson, N.B., Kiosses, W.B., Chiang, H.H., Anderson, R.G. & Schwartz, M.A.** (2004) Integrins regulate Rac targeting by internalization of membrane domains. *Science* **303**(5659), 839-42.
- Del Pozo, M.A., Kiosses, W.B., Alderson, N.B., Meller, N., Hahn, K.M. & Schwartz, M.A.** (2002) Integrins regulate GTP-Rac localized effector interactions through dissociation of Rho-GDI. *Nat Cell Biol* **4**(3), 232-9.
- del Pozo, M.A., Price, L.S., Alderson, N.B., Ren, X.D. & Schwartz, M.A.** (2000) Adhesion to the extracellular matrix regulates the coupling of the small GTPase Rac to its effector PAK. *Embo J* **19**(9), 2008-14.
- Delcommenne, M., Tan, C., Gray, V., Rue, L., Woodgett, J. & Dedhar, S.** (1998) Phosphoinositide-3-OH kinase-dependent regulation of glycogen synthase kinase 3 and protein kinase B/AKT by the integrin-linked kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(19), 11211-6.
- DeMali, K.A., Barlow, C.A. & Burridge, K.** (2002) Recruitment of the Arp2/3 complex to vinculin: coupling membrane protrusion to matrix adhesion. *J Cell Biol* **159**(5), 881-91.
- Deprez, J., Vertommen, D., Alessi, D.R., Hue, L. & Rider, M.H.** (1997) Phosphorylation and activation of heart 6-phosphofructo-2-kinase by protein kinase B and other protein kinases of the insulin signaling cascades. *The Journal Of Biological Chemistry* **272**(28), 17269-17275.
- Der, C.J., Krontiris, T.G. & Cooper, G.M.** (1982) Transforming genes of human bladder and lung carcinoma cell lines are homologous to the ras genes of Harvey and Kirsten sarcoma viruses. *Proc Natl Acad Sci U S A* **79**(11), 3637-40.
- DerMardirossian, C. & Bokoch, G.M.** (2005) GDIs: central regulatory molecules in Rho GTPase activation. *Trends Cell Biol* **15**(7), 356-63.
- DerMardirossian, C., Schnelzer, A. & Bokoch, G.M.** (2004) Phosphorylation of RhoGDI by Pak1 mediates dissociation of Rac GTPase. *Mol Cell* **15**(1), 117-27.
- Desai, A. & Mitchison, T.J.** (1997) Microtubule polymerization dynamics. *Annu Rev Cell Dev Biol* **13**, 83-117.
- Dhand, R., Hara, K., Hiles, I., Bax, B., Gout, I., Panayotou, G., Fry, M.J., Yonezawa, K., Kasuga, M. & Waterfield, M.D.** (1994) PI 3-kinase: structural and functional analysis of intersubunit interactions. *Embo J* **13**(3), 511-21.
- Dharmawardhane, S., Brownson, D., Lennartz, M. & Bokoch, G.M.** (1999) Localization of p21-activated kinase 1 (PAK1) to pseudopodia, membrane ruffles, and phagocytic cups in activated human neutrophils. *J Leukoc Biol* **66**(3), 521-7.
- Di Paolo, G., Moskowitz, H.S., Gipson, K., Wenk, M.R., Voronov, S., Obayashi, M., Flavell, R., Fitzsimonds, R.M., Ryan, T.A. & De Camilli, P.** (2004) Impaired PtdIns(4,5)P2 synthesis in nerve terminals produces defects in synaptic vesicle trafficking. *Nature* **431**(7007), 415-22.
- Diamond, M.S., Garcia-Aguilar, J., Bickford, J.K., Corbi, A.L. & Springer, T.A.** (1993) The I domain is a major recognition site on the leukocyte integrin Mac-1 (CD11b/CD18) for four distinct adhesion ligands. *J Cell Biol* **120**(4), 1031-43.
- Diekmann, D., Brill, S., Garrett, M.D., Totty, N., Hsuan, J., Monfries, C., Hall, C., Lim, L. & Hall, A.** (1991) Bcr encodes a GTPase-activating protein for p21rac. *Nature* **351**(6325), 400-2.
- Dimmeler, S., Fleming, I., Fisslthaler, B., Hermann, C., Busse, R. & Zeiher, A.M.** (1999) Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells

- by Akt-dependent phosphorylation. *Nature* **399**(6736), 601-605.
- DiNitto, J.P., Cronin, T.C. & Lambright, D.G.** (2003) Membrane recognition and targeting by lipid-binding domains. *Sci STKE* **2003**(213), re16.
- Djouder, N., Schmidt, G., Frings, M., Cavalie, A., Thelen, M. & Aktories, K.** (2001) Rac and Phosphatidylinositol 3-Kinase Regulate the Protein Kinase B in Fc $\{\epsilon\}$ RI Signaling in RBL 2H3 Mast Cells. *J Immunol* **166**(3), 1627-1634.
- Domin, J., Harper, L., Aubyn, D., Wheeler, M., Florey, O., Haskard, D., Yuan, M. & Zicha, D.** (2005) The class II phosphoinositide 3-kinase PI3K-C2beta regulates cell migration by a PtdIns3P dependent mechanism. *J Cell Physiol* **205**(3), 452-62.
- Domin, J., Pages, F., Volinia, S., Rittenhouse, S.E., Zvelebil, M.J., Stein, R.C. & Waterfield, M.D.** (1997) Cloning of a human phosphoinositide 3-kinase with a C2 domain that displays reduced sensitivity to the inhibitor wortmannin. *Biochem J* **326** (Pt 1), 139-47.
- Domin, J. & Waterfield, M.D.** (1997) Using structure to define the function of phosphoinositide 3-kinase family members. *FEBS Lett* **410**(1), 91-5.
- Donepudi, M. & Grutter, M.G.** (2002) Structure and zymogen activation of caspases. *Biophysical Chemistry* **101-102**, 145-153.
- Dong, L.Q., Landa, L.R., Wick, M.J., Zhu, L., Mukai, H., Ono, Y. & Liu, F.** (2000) Phosphorylation of protein kinase N by phosphoinositide-dependent protein kinase-1 mediates insulin signals to the actin cytoskeleton. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(10), 5089-94.
- Dong, L.Q., Zhang, R.B., Langlais, P., He, H., Clark, M., Zhu, L. & Liu, F.** (1999) Primary structure, tissue distribution, and expression of mouse phosphoinositide-dependent protein kinase-1, a protein kinase that phosphorylates and activates protein kinase Czeta. *J Biol Chem* **274**(12), 8117-22.
- Doughman, R.L., Firestone, A.J. & Anderson, R.A.** (2003) Phosphatidylinositol phosphate kinases put PI4,5P(2) in its place. *J Membr Biol* **194**(2), 77-89.
- Douma, S., Van Laar, T., Zevenhoven, J., Meuwissen, R., Van Garderen, E. & Peeper, D.S.** (2004) Suppression of anoikis and induction of metastasis by the neurotrophic receptor TrkB. *Nature* **430**(7003), 1034-9.
- Dowler, S., Currie, R.A., Campbell, D.G., Deak, M., Kular, G., Downes, C.P. & Alessi, D.R.** (2000) Identification of pleckstrin-homology-domain-containing proteins with novel phosphoinositide-binding specificities. *Biochem J* **351**(Pt 1), 19-31.
- Downward, J.** (1999) How BAD phosphorylation is good for survival. *Nat Cell Biol* **1**(2), E33-5.
- Downward, J.** (2004) PI 3-kinase, Akt and cell survival. *Semin Cell Dev Biol* **15**(2), 177-82.
- Du, K., Herzig, S., Kulkarni, R.N. & Montminy, M.** (2003) TRB3: a tribbles homolog that inhibits Akt/PKB activation by insulin in liver. *Science* **300**(5625), 1574-7.
- Du, K. & Montminy, M.** (1998) CREB is a regulatory target for the protein kinase Akt/PKB. *J Biol Chem* **273**(49), 32377-9.
- Du, K. & Tsichlis, P.N.** (2005) Regulation of the Akt kinase by interacting proteins. *Oncogene* **24**(50), 7401-9.
- Dugani, C.B. & Klip, A.** (2005) Glucose transporter 4: cycling, compartments and controversies. *EMBO Rep* **6**(12), 1137-42.
- 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** (Pt 2), 367-77.
- Earnshaw, W.C., Martins, L.M. & Kaufmann, S.H.** (1999) Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annu Rev Biochem* **68**, 383-424.
- Eden, S., Rohatgi, R., Podtelejnikov, A.V., Mann, M. & Kirschner, M.W.** (2002) Mechanism of regulation of WAVE1-induced actin nucleation by Rac1 and Nck. *Nature* **418**(6899), 790-3.
- Edinger, A.L. & Thompson, C.B.** (2004) An activated mTOR mutant supports growth factor-independent, nutrient-dependent cell survival. *Oncogene* **23**(33), 5654-63.
- Edwards, D.C., Sanders, L.C., Bokoch, G.M. & Gill, G.N.** (1999) Activation of LIM-kinase by Pak1 couples Rac/Cdc42 GTPase signalling to actin cytoskeletal dynamics. *Nat Cell Biol* **1**(5), 253-9.
- Edwards, L.A., Thiessen, B., Dragowska, W.H., Daynard, T., Bally, M.B. & Dedhar, S.** (2005) Inhibition of ILK in PTEN-mutant human glioblastomas inhibits PKB/Akt activation, induces apoptosis, and delays tumor growth. *Oncogene* **24**(22), 3596-605.
- Eicher, D.M.** (2003) IL-2 and IL-15 manifest opposing effects on activation of nuclear factor of activated T cells. *Cell Immunol* **223**(2), 133-42.
- Ellis, S. & Mellor, H.** (2000) The novel Rho-family GTPase rif regulates coordinated actin-based membrane rearrangements. *Curr Biol* **10**(21), 1387-90.
- Ellson, C.D., Gobert-Gosse, S., Anderson, K.E., Davidson, K., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Thuring, J.W., Cooper, M.A., Lim, Z.Y., Holmes, A.B., Gaffney, P.R., Coadwell, J., Chilvers, E.R., Hawkins, P.T. & Stephens, L.R.** (2001) PtdIns(3)P regulates the neutrophil oxidase complex by binding to the PX domain of p40(phox). *Nat Cell Biol* **3**(7), 679-82.

- Embi, N., Rylatt, D.B. & Cohen, P.** (1980) Glycogen synthase kinase-3 from rabbit skeletal muscle. Separation from cyclic-AMP-dependent protein kinase and phosphorylase kinase. *Eur J Biochem* **107**(2), 519-27.
- Etienne-Manneville, S. & Hall, A.** (2001) Integrin-mediated activation of Cdc42 controls cell polarity in migrating astrocytes through PKCzeta. *Cell* **106**(4), 489-98.
- Etienne-Manneville, S. & Hall, A.** (2003) Cdc42 regulates GSK-3beta and adenomatous polyposis coli to control cell polarity. *Nature* **421**(6924), 753-6.
- Falini, B., Tiacci, E., Liso, A., Basso, K., Sabattini, E., Pacini, R., Foa, R., Pulsoni, A., Dalla Favera, R. & Pileri, S.** (2004) Simple diagnostic assay for hairy cell leukaemia by immunocytochemical detection of annexin A1 (ANXA1). *Lancet* **363**(9424), 1869-70.
- Farias, E.F., Marzan, C. & Mira-y-Lopez, R.** (2005) Cellular retinol-binding protein-I inhibits PI3K/Akt signaling through a retinoic acid receptor-dependent mechanism that regulates p85-p110 heterodimerization. *Oncogene* **24**(9), 1598-606.
- Faure, J., Vignais, P.V. & Dagher, M.C.** (1999) Phosphoinositide-dependent activation of Rho A involves partial opening of the RhoA/Rho-GDI complex. *Eur J Biochem* **262**(3), 879-89.
- Feig, L.A.** (1999) Tools of the trade: use of dominant-inhibitory mutants of Ras-family GTPases. *Nat Cell Biol* **1**(2), E25-7.
- Feng, J., Park, J., Cron, P., Hess, D. & Hemmings, B.A.** (2004) Identification of a PKB/Akt hydrophobic motif Ser-473 kinase as DNA-dependent protein kinase. *J Biol Chem* **279**(39), 41189-96.
- Fernandez-Borja, M., Janssen, L., Verwoerd, D., Hordijk, P. & Neefjes, J.** (2005) RhoB regulates endosome transport by promoting actin assembly on endosomal membranes through Dia1. *J Cell Sci* **118**(Pt 12), 2661-70.
- Fievet, B.T., Gautreau, A., Roy, C., Del Maestro, L., Mangeat, P., Louvard, D. & Arpin, M.** (2004) Phosphoinositide binding and phosphorylation act sequentially in the activation mechanism of ezrin. *J Cell Biol* **164**(5), 653-9.
- Figuroa, C., Tarras, S., Taylor, J. & Vojtek, A.B.** (2003) Akt2 negatively regulates assembly of the POSH-MLK-JNK signaling complex. *J Biol Chem* **278**(48), 47922-7.
- Filippa, N., Sable, C.L., Filloux, C., Hemmings, B. & Van Obberghen, E.** (1999) Mechanism of protein kinase B activation by cyclic AMP-dependent protein kinase. *Mol Cell Biol* **19**(7), 4989-5000.
- Filippa, N., Sable, C.L., Hemmings, B.A. & Van Obberghen, E.** (2000) Effect of phosphoinositide-dependent kinase 1 on protein kinase B translocation and its subsequent activation. *Mol Cell Biol* **20**(15), 5712-21.
- Finbloom, D.S. & Wahl, L.M.** (1989) Characterization of a novel low affinity receptor for IFN-gamma on adherent human monocytes by radioligand binding studies and chemical cross-linking. *J Immunol* **142**(7), 2314-20.
- Flatau, G., Lemichez, E., Gauthier, M., Chardin, P., Paris, S., Fiorentini, C. & Boquet, P.** (1997) Toxin-induced activation of the G protein p21 Rho by deamidation of glutamine. *Nature* **387**(6634), 729-33.
- Fleming, I.N., Elliott, C.M., Buchanan, F.G., Downes, C.P. & Exton, J.H.** (1999) Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II regulates Tiam1 by reversible protein phosphorylation. *J Biol Chem* **274**(18), 12753-8.
- Fleming, I.N., Elliott, C.M., Collard, J.G. & Exton, J.H.** (1997) Lysophosphatidic acid induces threonine phosphorylation of Tiam1 in Swiss 3T3 fibroblasts via activation of protein kinase C. *J Biol Chem* **272**(52), 33105-10.
- Fontana, J., Fulton, D., Chen, Y., Fairchild, T.A., McCabe, T.J., Fujita, N., Tsuruo, T. & Sessa, W.C.** (2002) Domain mapping studies reveal that the M domain of hsp90 serves as a molecular scaffold to regulate Akt-dependent phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase and NO release. *Circ Res* **90**(8), 866-73.
- Forconi, F., Sahota, S.S., Raspadori, D., Mockridge, C.I., Lauria, F. & Stevenson, F.K.** (2001) Tumor cells of hairy cell leukemia express multiple clonally related immunoglobulin isotypes via RNA splicing. *Blood* **98**(4), 1174-81.
- Foukas, L.C., Beeton, C.A., Jensen, J., Phillips, W.A. & Shepherd, P.R.** (2004) Regulation of phosphoinositide 3-kinase by its intrinsic serine kinase activity in vivo. *Mol Cell Biol* **24**(3), 966-75.
- Franke, T.F., Tartof, K.D. & Tschlis, P.N.** (1994) The SH2-like Akt homology (AH) domain of c-akt is present in multiple copies in the genome of vertebrate and invertebrate eucaryotes. Cloning and characterization of the Drosophila melanogaster c-akt homolog Dakt1. *Oncogene* **9**(1), 141-8.
- Fransson, A., Ruusala, A. & Aspenstrom, P.** (2003) Atypical Rho GTPases have roles in mitochondrial homeostasis and apoptosis. *J Biol Chem* **278**(8), 6495-502.
- Fransson, S., Ruusala, A. & Aspenstrom, P.** (2006) The atypical Rho GTPases Miro-1 and Miro-2 have essential roles in mitochondrial trafficking. *Biochem Biophys Res Commun* **344**(2), 500-10.
- Freeburn, R.W., Wright, K.L., Burgess, S.J., Astoul, E., Cantrell, D.A. & Ward, S.G.** (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**(10), 5441-50.

- Freeman, J.L., Abo, A. & Lambeth, J.D.** (1996) Rac "insert region" is a novel effector region that is implicated in the activation of NADPH oxidase, but not PAK65. *J Biol Chem* **271**(33), 19794-801.
- Freemont, A.J.** (1998) Demystified ... adhesion molecules. *Mol Pathol* **51**(4), 175-84.
- French, S.W., Shen, R.R., Koh, P.J., Malone, C.S., Mallick, P. & Teitell, M.A.** (2002) A modeled hydrophobic domain on the TCL1 oncoprotein mediates association with AKT at the cytoplasmic membrane. *Biochemistry* **41**(20), 6376-82.
- Fresno Vara, J.A., Casado, E., de Castro, J., Cejas, P., Belda-Iniesta, C. & Gonzalez-Baron, M.** (2004) PI3K/Akt signalling pathway and cancer. *Cancer Treat Rev* **30**(2), 193-204.
- Frisch, S.M. & Francis, H.** (1994) Disruption of epithelial cell-matrix interactions induces apoptosis. *J Cell Biol* **124**(4), 619-26.
- Frisch, S.M. & Ruoslahti, E.** (1997) Integrins and anoikis. *Curr Opin Cell Biol* **9**(5), 701-6.
- Fruman, D.A., Mauvais-Jarvis, F., Pollard, D.A., Yballe, C.M., Brazil, D., Bronson, R.T., Kahn, C.R. & Cantley, L.C.** (2000) Hypoglycaemia, liver necrosis and perinatal death in mice lacking all isoforms of phosphoinositide 3-kinase p85 alpha. *Nat Genet* **26**(3), 379-82.
- Fu, Z., Aronoff-Spencer, E., Wu, H., Gerfen, G.J. & Backer, J.M.** (2004) The iSH2 domain of PI 3-kinase is a rigid tether for p110 and not a conformational switch. *Arch Biochem Biophys* **432**(2), 244-51.
- Fujisawa, K., Madaule, P., Ishizaki, T., Watanabe, G., Bito, H., Saito, Y., Hall, A. & Narumiya, S.** (1998) Different regions of Rho determine Rho-selective binding of different classes of Rho target molecules. *J Biol Chem* **273**(30), 18943-9.
- Fukata, M., Watanabe, T., Noritake, J., Nakagawa, M., Yamaga, M., Kuroda, S., Matsuura, Y., Iwamatsu, A., Perez, F. & Kaibuchi, K.** (2002a) Rac1 and Cdc42 capture microtubules through IQGAP1 and CLIP-170. *Cell* **109**(7), 873-85.
- Fukata, Y., Itoh, T.J., Kimura, T., Menager, C., Nishimura, T., Shiromizu, T., Watanabe, H., Inagaki, N., Iwamatsu, A., Hotani, H. & Kaibuchi, K.** (2002b) CRMP-2 binds to tubulin heterodimers to promote microtubule assembly. *Nat Cell Biol* **4**(8), 583-91.
- Fukuda, A., Hikita, A., Wakeyama, H., Akiyama, T., Oda, H., Nakamura, K. & Tanaka, S.** (2005) Regulation of osteoclast apoptosis and motility by small GTPase binding protein Rac1. *J Bone Miner Res* **20**(12), 2245-53.
- Fukumoto, Y., Kaibuchi, K., Hori, Y., Fujioka, H., Araki, S., Ueda, T., Kikuchi, A. & Takai, Y.** (1990) Molecular cloning and characterization of a novel type of regulatory protein (GDI) for the rho proteins, ras p21-like small GTP-binding proteins. *Oncogene* **5**(9), 1321-8.
- Furumoto, K., Inoue, E., Nagao, N., Hiyama, E. & Miwa, N.** (1998) Age-dependent telomere shortening is slowed down by enrichment of intracellular vitamin C via suppression of oxidative stress. *Life Sciences* **63**(11), 935-948.
- Gaidarov, I., Smith, M.E., Domin, J. & Keen, J.H.** (2001) The class II phosphoinositide 3-kinase C2alpha is activated by clathrin and regulates clathrin-mediated membrane trafficking. *Mol Cell* **7**(2), 443-9.
- Gaidarov, I., Zhao, Y. & Keen, J.H.** (2005) Individual phosphoinositide 3-kinase C2alpha domain activities independently regulate clathrin function. *J Biol Chem* **280**(49), 40766-72.
- Gallagher, E.D., Gutowski, S., Sternweis, P.C. & Cobb, M.H.** (2004) RhoA binds to the amino terminus of MEKK1 and regulates its kinase activity. *J Biol Chem* **279**(3), 1872-7.
- Gamblin, S.J. & Smerdon, S.J.** (1998) GTPase-activating proteins and their complexes. *Curr Opin Struct Biol* **8**(2), 195-201.
- Gamliel, H., Brownstein, B.H., Gurfel, D., Wu, S.H., Rosner, M.C. & Golomb, H.M.** (1990) B-cell growth factor-induced and alpha-interferon-inhibited proliferation of hairy cells coincides with modulation of cell surface antigens. *Cancer Res* **50**(13), 4111-20.
- Ganesan, L.P., Joshi, T., Fang, H., Kutala, V.K., Roda, J., Trotta, R., Lehman, A., Kuppusamy, P., Byrd, J.C., Carson, W.E., Caligiuri, M.A. & Tridandapani, S.** (2006) Fc{gamma}R-induced production of superoxide and inflammatory cytokines is differentially regulated by SHIP through its influence on PI3K and/or Ras/Erk pathways. *Blood*.
- Gao, T., Furnari, F. & Newton, A.C.** (2005) PHLPP: a phosphatase that directly dephosphorylates Akt, promotes apoptosis, and suppresses tumor growth. *Mol Cell* **18**(1), 13-24.
- Gao, Y., Dickerson, J.B., Guo, F., Zheng, J. & Zheng, Y.** (2004) Rational design and characterization of a Rac GTPase-specific small molecule inhibitor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(20), 7618-23.
- Gao, Y., Xing, J., Streuli, M., Leto, T.L. & Zheng, Y.** (2001) Trp(56) of rac1 specifies interaction with a subset of guanine nucleotide exchange factors. *J Biol Chem* **276**(50), 47530-41.
- Garcia-Alvarez, B., de Pereda, J.M., Calderwood, D.A., Ulmer, T.S., Critchley, D., Campbell, I.D., Ginsberg, M.H. & Liddington, R.C.** (2003) Structural determinants of integrin recognition by talin. *Mol Cell* **11**(1), 49-58.
- Gardiner, E.M., Pestonjamas, K.N., Bohl, B.P., Chamberlain, C., Hahn, K.M. & Bokoch, G.M.** (2002) Spatial and temporal analysis of Rac activation during live neutrophil chemotaxis. *Curr Biol* **12**(23), 2029-34.

- Gasman, S., Kalaidzidis, Y. & Zerial, M.** (2003) RhoD regulates endosome dynamics through Diaphanous-related Formin and Src tyrosine kinase. *Nat Cell Biol* **5**(3), 195-204.
- Gelkop, S., Babichev, Y. & Isakov, N.** (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., Valentine, M.A., Degos, L., Sigaux, F. & Kolb, J.P.** (1991) Hyperphosphorylation of CD20 in hairy cells. Alteration by low molecular weight B cell growth factor and IFN-alpha. *J Immunol* **146**(3), 870-8.
- Genot, E.M., Arrieumerlou, C., Ku, G., Burgering, B.M., Weiss, A. & Kramer, I.M.** (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.
- Ghomashchi, F., Zhang, X., Liu, L. & Gelb, M.H.** (1995) Binding of prenylated and polybasic peptides to membranes: affinities and intervesicle exchange. *Biochemistry* **34**(37), 11910-8.
- Giancotti, F.G.** (2000) Complexity and specificity of integrin signalling. *Nat Cell Biol* **2**(1), E13-4.
- Giancotti, F.G. & Ruoslahti, E.** (1999) Integrin signaling. *Science* **285**(5430), 1028-32.
- Gillooly, D.J., Simonsen, A. & Stenmark, H.** (2001) Cellular functions of phosphatidylinositol 3-phosphate and FYVE domain proteins. *Biochem J* **355**(Pt 2), 249-58.
- Gills, J.J. & Dennis, P.A.** (2004) The development of phosphatidylinositol ether lipid analogues as inhibitors of the serine/threonine kinase, Akt. *Expert Opin Investig Drugs* **13**(7), 787-97.
- Gilmore, A.P.** (2005) Anoikis. *Cell Death Differ* **12** Suppl 2, 1473-7.
- Gimona, M., Kaverina, I., Resch, G.P., Vignal, E. & Burgstaller, G.** (2003) Calponin repeats regulate actin filament stability and formation of podosomes in smooth muscle cells. *Mol Biol Cell* **14**(6), 2482-91.
- Giri, J.G., Ahdieh, M., Eisenman, J., Shanebeck, K., Grabstein, K., Kumaki, S., Namen, A., Park, L.S., Cosman, D. & Anderson, D.** (1994) Utilization of the beta and gamma chains of the IL-2 receptor by the novel cytokine IL-15. *Embo J* **13**(12), 2822-30.
- Giri, L., Mutalik, V.K. & Venkatesh, K.** (2004) A steady state analysis indicates that negative feedback regulation of PTP1B by Akt elicits bistability in insulin-stimulated GLUT4 translocation. *Theor Biol Med Model* **1**(1), 2.
- Glogauer, M., Arora, P., Chou, D., Janmey, P.A., Downey, G.P. & McCulloch, C.A.** (1998) The role of actin-binding protein 280 in integrin-dependent mechanoprotection. *J Biol Chem* **273**(3), 1689-98.
- Godi, A., Di Campi, A., Konstantakopoulos, A., Di Tullio, G., Alessi, D.R., Kular, G.S., Daniele, T., Marra, P., Lucocq, J.M. & De Matteis, M.A.** (2004) FAPPs control Golgi-to-cell-surface membrane traffic by binding to ARF and PtdIns(4)P. *Nat Cell Biol* **6**(5), 393-404.
- Gold, M.R.** (2003) Akt is TCL-ish: implications for B-cell lymphoma. *Trends Immunol* **24**(3), 104-8.
- Goldrath, A.W., Sivakumar, P.V., Glaccum, M., Kennedy, M.K., Bevan, M.J., Benoist, C., Mathis, D. & Butz, E.A.** (2002) Cytokine requirements for acute and Basal homeostatic proliferation of naive and memory CD8+ T cells. *The Journal Of Experimental Medicine* **195**(12), 1515-1522.
- Golub, T. & Caroni, P.** (2005) PI(4,5)P2-dependent microdomain assemblies capture microtubules to promote and control leading edge motility. *J Cell Biol* **169**(1), 151-65.
- Gonzalez, I., Tripathi, G., Carter, E.J., Cobb, L.J., Salih, D.A., Lovett, F.A., Holding, C. & Pell, J.M.** (2004) Akt2, a novel functional link between p38 mitogen-activated protein kinase and phosphatidylinositol 3-kinase pathways in myogenesis. *Mol Cell Biol* **24**(9), 3607-22.
- Gorvel, J.P., Chang, T.C., Boretto, J., Azuma, T. & Chavrier, P.** (1998) Differential properties of D4/LyGDI versus RhoGDI: phosphorylation and rho GTPase selectivity. *FEBS Lett* **422**(2), 269-73.
- Gotoh, Y., Oishi, K., Shibata, H., Yamagiwa, A., Isagawa, T., Nishimura, T., Goyama, E., Takahashi, M., Mukai, H. & Ono, Y.** (2004) Protein kinase PKN1 associates with TRAF2 and is involved in TRAF2-NF-kappaB signaling pathway. *Biochem Biophys Res Commun* **314**(3), 688-94.
- Gotta, M., Abraham, M.C. & Ahringer, J.** (2001) CDC-42 controls early cell polarity and spindle orientation in *C. elegans*. *Curr Biol* **11**(7), 482-8.
- Gout, I., Middleton, G., Adu, J., Ninkina, N.N., Drobot, L.B., Filonenko, V., Matsuka, G., Davies, A.M., Waterfield, M. & Buchman, V.L.** (2000) Negative regulation of PI 3-kinase by Ruk, a novel adaptor protein. *Embo J* **19**(15), 4015-25.
- Gozani, O., Karuman, P., Jones, D.R., Ivanov, D., Cha, J., Lugovskoy, A.A., Baird, C.L., Zhu, H., Field, S.J., Lessnick, S.L., Villasenor, J., Mehrotra, B., Chen, J., Rao, V.R., Brugge, J.S., Ferguson, C.G., Payrastre, B., Myszka, D.G., Cantley, L.C., Wagner, G., Divecha, N., Prestwich, G.D. & Yuan, J.** (2003) The PHD finger of the chromatin-associated protein ING2 functions as a nuclear phosphoinositide receptor. *Cell* **114**(1), 99-111.
- Grabstein, K.H., Eisenman, J., Shanebeck, K., Rauch, C., Srinivasan, S., Fung, V., Beers, C., Richardson, J., Schoenborn, M.A., Ahdieh, M. & et al.** (1994) Cloning of a T cell growth factor that interacts with the beta chain of the interleukin-2 receptor. *Science* **264**(5161), 965-8.

- Grashoff, C., Aszodi, A., Sakai, T., Hunziker, E.B. & Fassler, R. (2003) Integrin-linked kinase regulates chondrocyte shape and proliferation. *EMBO Rep* **4**(4), 432-8.
- Greider, C.W. (1996) Telomere length regulation. *Annual Review Of Biochemistry* **65**, 337-365.
- Greider, C.W. & Blackburn, E.H. (1989) A telomeric sequence in the RNA of Tetrahymena telomerase required for telomere repeat synthesis. *Nature* **337**(6205), 331-337.
- Grever, M., Kopecky, K., Foucar, M.K., Head, D., Bennett, J.M., Hutchison, R.E., Corbett, W.E., Cassileth, P.A., Habermann, T., Golomb, H. & et al. (1995) Randomized comparison of pentostatin versus interferon alfa-2a in previously untreated patients with hairy cell leukemia: an intergroup study. *J Clin Oncol* **13**(4), 974-82.
- Gridley, S., Lane, W.S., Garner, C.W. & Lienhard, G.E. (2005) Novel insulin-elicited phosphoproteins in adipocytes. *Cell Signal* **17**(1), 59-66.
- Grimsley, C.M., Kinchen, J.M., Tosello-Trampont, A.C., Brugnera, E., Haney, L.B., Lu, M., Chen, Q., Klingele, D., Hengartner, M.O. & Ravichandran, K.S. (2004) Dock180 and ELMO1 proteins cooperate to promote evolutionarily conserved Rac-dependent cell migration. *J Biol Chem* **279**(7), 6087-97.
- Grimsley, C.M., Lu, M., Haney, L.B., Kinchen, J.M. & Ravichandran, K.S. (2006) Characterization of a novel interaction between ELMO1 and ERM proteins. *J Biol Chem* **281**(9), 5928-37.
- Grizot, S., Faure, J., Fieschi, F., Vignais, P.V., Dagher, M.C. & Pebay-Peyroula, E. (2001) Crystal structure of the Rac1-RhoGDI complex involved in nadph oxidase activation. *Biochemistry* **40**(34), 10007-13.
- Grodzki, A.C., Pastor, M.V., Sousa, J.F., Oliver, C. & Jamur, M.C. (2003) Differential expression of integrin subunits on adherent and nonadherent mast cells. *Braz J Med Biol Res* **36**(8), 1101-9.
- Grossmann, J. (2002) Molecular mechanisms of "detachment-induced apoptosis--Anoikis". *Apoptosis* **7**(3), 247-60.
- Gruneberg, U., Neef, R., Li, X., Chan, E.H., Chalamalasetty, R.B., Nigg, E.A. & Barr, F.A. (2006) KIF14 and citron kinase act together to promote efficient cytokinesis. *J Cell Biol* **172**(3), 363-72.
- Gu, Y., Filippi, M.D., Cancelas, J.A., Sieftring, J.E., Williams, E.P., Jasti, A.C., Harris, C.E., Lee, A.W., Prabhakar, R., Atkinson, S.J., Kwiatkowski, D.J. & Williams, D.A. (2003) Hematopoietic cell regulation by Rac1 and Rac2 guanosine triphosphatases. *Science* **302**(5644), 445-9.
- Gumbiner, B.M. (1996) Cell adhesion: the molecular basis of tissue architecture and morphogenesis. *Cell* **84**(3), 345-57.
- Haas-Kogan, D., Shalev, N., Wong, M., Mills, G., Yount, G. & Stokoe, D. (1998) Protein kinase B (PKB/Akt) activity is elevated in glioblastoma cells due to mutation of the tumor suppressor PTEN/MMAC. *Curr Biol* **8**(21), 1195-8.
- Habermann, T.M., Andersen, J.W., Cassileth, P.A., Bennett, J.M. & Oken, M.M. (1992) Sequential administration of recombinant interferon alpha and deoxycoformycin in the treatment of hairy cell leukaemia. *Br J Haematol* **80**(4), 466-71.
- Habib, A.A., Hognason, T., Ren, J., Stefansson, K. & Ratan, R.R. (1998a) The epidermal growth factor receptor associates with and recruits phosphatidylinositol 3-kinase to the platelet-derived growth factor beta receptor. *J Biol Chem* **273**(12), 6885-91.
- Habib, T., Hejna, J.A., Moses, R.E. & Decker, S.J. (1998b) Growth factors and insulin stimulate tyrosine phosphorylation of the 51C/SHIP2 protein. *J Biol Chem* **273**(29), 18605-9.
- Haendeler, J., Hoffmann, J., Rahman, S., Zeiher, A.M. & Dimmeler, S. (2003) Regulation of telomerase activity and anti-apoptotic function by protein-protein interaction and phosphorylation. *FEBS Letters* **536**(1-3), 180-186.
- 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**(1), 64-74.
- Hall, A. (2005) Rho GTPases and the control of cell behaviour. *Biochem Soc Trans* **33**(Pt 5), 891-5.
- Hall, A., Paterson, H.F., Adamson, P. & Ridley, A.J. (1993) Cellular responses regulated by rho-related small GTP-binding proteins. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **340**(1293), 267-71.
- Hall, C., Michael, G.J., Cann, N., Ferrari, G., Teo, M., Jacobs, T., Monfries, C. & Lim, L. (2001) alpha2-chimaerin, a Cdc42/Rac1 regulator, is selectively expressed in the rat embryonic nervous system and is involved in neuritogenesis in N1E-115 neuroblastoma cells. *J Neurosci* **21**(14), 5191-202.
- Hamada, K., Shimizu, T., Matsui, T., Tsukita, S. & Hakoshima, T. (2000) Structural basis of the membrane-targeting and unmasking mechanisms of the radixin FERM domain. *Embo J* **19**(17), 4449-62.
- Hamaguchi, M., Meth, J.L., von Klitzing, C., Wei, W., Esposito, D., Rodgers, L., Walsh, T., Welsh, P., King, M.C. & Wigler, M.H. (2002) DBC2, a candidate for a tumor suppressor gene involved in breast cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(21), 13647-52.
- Han, J., Luby-Phelps, K., Das, B., Shu, X., Xia, Y., Mosteller, R.D., Krishna, U.M., Falck, J.R., White, M.A. & Broek, D. (1998) Role of substrates and products of PI 3-kinase in regulating activation of Rac-related guanosine triphosphatases by Vav. *Science* **279**(5350), 558-60.

- Hancock, J.F.** (1995) Prenylation and palmitoylation analysis. *Methods Enzymol* **255**, 237-45.
- Hannigan, G.E., Leung-Hagesteijn, C., Fitz-Gibbon, L., Coppolino, M.G., Radeva, G., Filmus, J., Bell, J.C. & Dedhar, S.** (1996) Regulation of cell adhesion and anchorage-dependent growth by a new beta 1-integrin-linked protein kinase. *Nature* **379**(6560), 91-6.
- Hansen, M.D. & Nelson, W.J.** (2001) Serum-activated assembly and membrane translocation of an endogenous Rac1:effector complex. *Curr Biol* **11**(5), 356-60.
- Hardt, W.D., Chen, L.M., Schuebel, K.E., Bustelo, X.R. & Galan, J.E.** (1998) *S. typhimurium* encodes an activator of Rho GTPases that induces membrane ruffling and nuclear responses in host cells. *Cell* **93**(5), 815-26.
- Harlan, J.E., Hajduk, P.J., Yoon, H.S. & Fesik, S.W.** (1994) Pleckstrin homology domains bind to phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate. *Nature* **371**(6493), 168-70.
- Harpur, A.G., Layton, M.J., Das, P., Bottomley, M.J., Panayotou, G., Driscoll, P.C. & Waterfield, M.D.** (1999) Intermolecular interactions of the p85alpha regulatory subunit of phosphatidylinositol 3-kinase. *J Biol Chem* **274**(18), 12323-32.
- Hart, M.J., Eva, A., Evans, T., Aaronson, S.A. & Cerione, R.A.** (1991) Catalysis of guanine nucleotide exchange on the CDC42Hs protein by the dbl oncogene product. *Nature* **354**(6351), 311-4.
- Hart, M.J., Eva, A., Zangrilli, D., Aaronson, S.A., Evans, T., Cerione, R.A. & Zheng, Y.** (1994) Cellular transformation and guanine nucleotide exchange activity are catalyzed by a common domain on the dbl oncogene product. *J Biol Chem* **269**(1), 62-5.
- Harte, M.T., Hildebrand, J.D., Burnham, M.R., Bouton, A.H. & Parsons, J.T.** (1996) p130Cas, a substrate associated with v-Src and v-Crk, localizes to focal adhesions and binds to focal adhesion kinase. *J Biol Chem* **271**(23), 13649-55.
- Hartmann, C., Bartels, G., Gehlhaar, C., Holtkamp, N. & von Deimling, A.** (2005) PIK3CA mutations in glioblastoma multiforme. *Acta Neuropathol (Berl)* **109**(6), 639-42.
- Hawkins, P.T., Eguinoa, A., Qiu, R.G., Stokoe, D., Cooke, F.T., Walters, R., Wennstrom, S., Claesson-Welsh, L., Evans, T., Symons, M. & et al.** (1995) PDGF stimulates an increase in GTP-Rac via activation of phosphoinositide 3-kinase. *Curr Biol* **5**(4), 393-403.
- Hawkins, P.T., Jackson, T.R. & Stephens, L.R.** (1992) Platelet-derived growth factor stimulates synthesis of PtdIns(3,4,5)P₃ by activating a PtdIns(4,5)P₂ 3-OH kinase. *Nature* **358**(6382), 157-9.
- Hayakawa, M., Miyashita, H., Sakamoto, I., Kitagawa, M., Tanaka, H., Yasuda, H., Karin, M. & Kikugawa, K.** (2003) Evidence that reactive oxygen species do not mediate NF-kappaB activation. *Embo J* **22**(13), 3356-66.
- Helgason, C.D., Damen, J.E., Rosten, P., Grewal, R., Sorensen, P., Chappel, S.M., Borowski, A., Jirik, F., Krystal, G. & Humphries, R.K.** (1998) Targeted disruption of SHIP leads to hemopoietic perturbations, lung pathology, and a shortened life span. *Genes Dev* **12**(11), 1610-20.
- Hengartner, M.O.** (2000) The biochemistry of apoptosis. *Nature* **407**(6805), 770-6.
- Heo, J., Thapar, R. & Campbell, S.L.** (2005) Recognition and activation of Rho GTPases by Vav1 and Vav2 guanine nucleotide exchange factors. *Biochemistry* **44**(17), 6573-85.
- Heraud, J.M., Racaud-Sultan, C., Gironcel, D., Albiges-Rizo, C., Giacomini, T., Roques, S., Martel, V., Breton-Douillon, M., Perret, B. & Chap, H.** (1998) Lipid products of phosphoinositide 3-kinase and phosphatidylinositol 4',5'-bisphosphate are both required for ADP-dependent platelet spreading. *J Biol Chem* **273**(28), 17817-23.
- Herman, P.K., Stack, J.H. & Emr, S.D.** (1992) An essential role for a protein and lipid kinase complex in secretory protein sorting. *Trends Cell Biol* **2**(12), 363-8.
- Heslop, H.E., Brenner, M.K., Ganeshaguru, K. & Hoffbrand, A.V.** (1991) Possible mechanism of action of interferon alpha in chronic B-cell malignancies. *Br J Haematol* **79** Suppl 1, 14-6.
- Higuchi, M., Masuyama, N., Fukui, Y., Suzuki, A. & Gotoh, Y.** (2001) Akt mediates Rac/Cdc42-regulated cell motility in growth factor-stimulated cells and in invasive PTEN knockout cells. *Curr Biol* **11**(24), 1958-62.
- Hildebrand, J.D., Schaller, M.D. & Parsons, J.T.** (1995) Paxillin, a tyrosine phosphorylated focal adhesion-associated protein binds to the carboxyl terminal domain of focal adhesion kinase. *Mol Biol Cell* **6**(6), 637-47.
- Hill, C.S., Wynne, J. & Treisman, R.** (1995) The Rho family GTPases RhoA, Rac1, and CDC42Hs regulate transcriptional activation by SRF. *Cell* **81**(7), 1159-70.
- Hill, K.M., Huang, Y., Yip, S.C., Yu, J., Segall, J.E. & Backer, J.M.** (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.
- Hill, M.M., Feng, J. & Hemmings, B.A.** (2002) Identification of a plasma membrane Raft-associated PKB Ser473 kinase activity that is distinct from ILK and PDK1. *Curr Biol* **12**(14), 1251-5.
- Hirshberg, M., Stockley, R.W., Dodson, G. & Webb, M.R.** (1997) The crystal structure of human rac1, a member of the rho-family complexed with a GTP analogue. *Nat Struct Biol* **4**(2), 147-52.

- Ho, H.Y., Rohatgi, R., Lebensohn, A.M., Le, M., Li, J., Gygi, S.P. & Kirschner, M.W.** (2004) Toca-1 mediates Cdc42-dependent actin nucleation by activating the N-WASP-WIP complex. *Cell* **118**(2), 203-16.
- Hodgkinson, C.P., Sale, E.M. & Sale, G.J.** (2002) Characterization of PDK2 activity against protein kinase B gamma. *Biochemistry* **41**(32), 10351-9.
- Hoffman, G.R., Nassar, N. & Cerione, R.A.** (2000) Structure of the Rho family GTP-binding protein Cdc42 in complex with the multifunctional regulator RhoGDI. *Cell* **100**(3), 345-56.
- Horiguchi, Y., Inoue, N., Masuda, M., Kashimoto, T., Katahira, J., Sugimoto, N. & Matsuda, M.** (1997) Bordetella bronchiseptica dermonecrotizing toxin induces reorganization of actin stress fibers through deamidation of Gln-63 of the GTP-binding protein Rho. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(21), 11623-6.
- Horn, S., Meyer, J., Heukeshoven, J., Fehse, B., Schulze, C., Li, S., Frey, J., Poll, S., Stocking, C. & Jucker, M.** (2001) The inositol 5-phosphatase SHIP is expressed as 145 and 135 kDa proteins in blood and bone marrow cells in vivo, whereas carboxyl-truncated forms of SHIP are generated by proteolytic cleavage in vitro. *Leukemia* **15**(1), 112-20.
- Horwitz, A., Duggan, K., Buck, C., Beckerle, M.C. & Burridge, K.** (1986) Interaction of plasma membrane fibronectin receptor with talin--a transmembrane linkage. *Nature* **320**(6062), 531-3.
- Howe, A.K. & Juliano, R.L.** (2000) Regulation of anchorage-dependent signal transduction by protein kinase A and p21-activated kinase. *Nat Cell Biol* **2**(9), 593-600.
- Hoyal, C.R., Gutierrez, A., Young, B.M., Catz, S.D., Lin, J.H., Tschlis, P.N. & Babior, B.M.** (2003) Modulation of p47PHOX activity by site-specific phosphorylation: Akt-dependent activation of the NADPH oxidase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(9), 5130-5.
- Hu, Y., Liu, Z. & Ye, K.** (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**(46), 16853-8.
- Huang, C., Rajfur, Z., Borchers, C., Schaller, M.D. & Jacobson, K.** (2003a) JNK phosphorylates paxillin and regulates cell migration. *Nature* **424**(6945), 219-23.
- Huang, M. & Prendergast, G.C.** (2006) RhoB in cancer suppression. *Histol Histopathol* **21**(2), 213-8.
- Huang, S., Lifshitz, L., Patki-Kamath, V., Tuft, R., Fogarty, K. & Czech, M.P.** (2004) Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate-rich plasma membrane patches organize active zones of endocytosis and ruffling in cultured adipocytes. *Mol Cell Biol* **24**(20), 9102-23.
- Huang, X., Begley, M., Morgenstern, K.A., Gu, Y., Rose, P., Zhao, H. & Zhu, X.** (2003b) Crystal structure of an inactive Akt2 kinase domain. *Structure* **11**(1), 21-30.
- Huang, X.Z., Chen, A., Agrez, M. & Sheppard, D.** (1995) A point mutation in the integrin beta 6 subunit abolishes both alpha v beta 6 binding to fibronectin and receptor localization to focal contacts. *Am J Respir Cell Mol Biol* **13**(2), 245-51.
- Humphries, M.J.** (2000) Integrin cell adhesion receptors and the concept of agonism. *Trends Pharmacol Sci* **21**(1), 29-32.
- Hussain, N.K., Jenna, S., Glogauer, M., Quinn, C.C., Wasiak, S., Guipponi, M., Antonarakis, S.E., Kay, B.K., Stossel, T.P., Lamarche-Vane, N. & McPherson, P.S.** (2001) Endocytic protein intersectin-1 regulates actin assembly via Cdc42 and N-WASP. *Nat Cell Biol* **3**(10), 927-32.
- Hynes, R.O.** (1992) Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell* **69**(1), 11-25.
- Ihara, K., Muraguchi, S., Kato, M., Shimizu, T., Shirakawa, M., Kuroda, S., Kaibuchi, K. & Hakoshima, T.** (1998) Crystal structure of human RhoA in a dominantly active form complexed with a GTP analogue. *J Biol Chem* **273**(16), 9656-66.
- Ingle, E. & Hemmings, B.A.** (2000) PKB/Akt interacts with inosine-5' monophosphate dehydrogenase through its pleckstrin homology domain. *FEBS Lett* **478**(3), 253-9.
- Innocenti, M., Frittoli, E., Ponzanelli, I., Falck, J.R., Brachmann, S.M., Di Fiore, P.P. & Scita, G.** (2003) Phosphoinositide 3-kinase activates Rac by entering in a complex with Eps8, Abi1, and Sos-1. *J Cell Biol* **160**(1), 17-23.
- Inoki, K., Li, Y., Zhu, T., Wu, J. & Guan, K.-L.** (2002) TSC2 is phosphorylated and inhibited by Akt and suppresses mTOR signalling. *Nature Cell Biology* **4**(9), 648-657.
- Ishihara, H., Sasaoka, T., Hori, H., Wada, T., Hirai, H., Haruta, T., Langlois, W.J. & Kobayashi, M.** (1999) Molecular cloning of rat SH2-containing inositol phosphatase 2 (SHIP2) and its role in the regulation of insulin signaling. *Biochem Biophys Res Commun* **260**(1), 265-72.
- Isnardi, I., Bruhns, P., Bismuth, G., Fridman, W.H. & Daeron, M.** (2006) The SH2 domain-containing inositol 5-phosphatase SHIP1 is recruited to the intracytoplasmic domain of human Fc gammaRIIB and is mandatory for negative regulation of B cell activation. *Immunol Lett* **104**(1-2), 156-65.
- Itoh, R.E., Kurokawa, K., Ohba, Y., Yoshizaki, H., Mochizuki, N. & Matsuda, M.** (2002) Activation of rac and cdc42 video imaged by fluorescent resonance energy transfer-based single-molecule probes in the membrane of living cells. *Mol Cell Biol* **22**(18), 6582-91.

- Itoh, T., Koshiba, S., Kigawa, T., Kikuchi, A., Yokoyama, S. & Takenawa, T. (2001) Role of the ENTH domain in phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate binding and endocytosis. *Science* **291**(5506), 1047-51.
- Ivaska, J., Reunanen, H., Westermarck, J., Koivisto, L., Kahari, V.M. & Heino, J. (1999) Integrin $\alpha 2\beta 1$ mediates isoform-specific activation of p38 and upregulation of collagen gene transcription by a mechanism involving the $\alpha 2$ cytoplasmic tail. *J Cell Biol* **147**(2), 401-16.
- Jaffe, A.B., Aspenstrom, P. & Hall, A. (2004) Human CNK1 acts as a scaffold protein, linking Rho and Ras signal transduction pathways. *Mol Cell Biol* **24**(4), 1736-46.
- Jahn, T., Seipel, P., Urschel, S., Peschel, C. & Duyster, J. (2002) Role for the adaptor protein Grb10 in the activation of Akt. *Mol Cell Biol* **22**(4), 979-91.
- James, S.R., Downes, C.P., Gigg, R., Grove, S.J., Holmes, A.B. & Alessi, D.R. (1996) Specific binding of the Akt-1 protein kinase to phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate without subsequent activation. *Biochem J* **315** (Pt 3), 709-13.
- Janetopoulos, C., Borleis, J., Vazquez, F., Iijima, M. & Devreotes, P. (2005) Temporal and spatial regulation of phosphoinositide signaling mediates cytokinesis. *Dev Cell* **8**(4), 467-77.
- Janmey, P.A., Xian, W. & Flanagan, L.A. (1999) Controlling cytoskeleton structure by phosphoinositide-protein interactions: phosphoinositide binding protein domains and effects of lipid packing. *Chem Phys Lipids* **101**(1), 93-107.
- Jansen, J. & Hermans, J. (1981) Splenectomy in hairy cell leukemia: a retrospective multicenter analysis. *Cancer* **47**(8), 2066-76.
- Jensen, C.J., Buch, M.B., Krag, T.O., Hemmings, B.A., Gammeltoft, S. & Frodin, M. (1999) 90-kDa ribosomal S6 kinase is phosphorylated and activated by 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1. *J Biol Chem* **274**(38), 27168-76.
- Jiang, T. & Qiu, Y. (2003) Interaction between Src and a C-terminal proline-rich motif of Akt is required for Akt activation. *J Biol Chem* **278**(18), 15789-93.
- Jimenez, C., Hernandez, C., Pimentel, B. & Carrera, A.C. (2002) The p85 regulatory subunit controls sequential activation of phosphoinositide 3-kinase by Tyr kinases and Ras. *J Biol Chem* **277**(44), 41556-62.
- Jimenez, C., Portela, R.A., Mellado, M., Rodriguez-Frade, J.M., Collard, J., Serrano, A., Martinez, A.C., Avila, J. & Carrera, A.C. (2000) Role of the PI3K regulatory subunit in the control of actin organization and cell migration. *J Cell Biol* **151**(2), 249-62.
- Joberty, G., Perlungher, R.R. & Macara, I.G. (1999) The Borgs, a new family of Cdc42 and TC10 GTPase-interacting proteins. *Mol Cell Biol* **19**(10), 6585-97.
- Joberty, G., Perlungher, R.R., Sheffield, P.J., Kinoshita, M., Noda, M., Haystead, T. & Macara, I.G. (2001) Borg proteins control septin organization and are negatively regulated by Cdc42. *Nat Cell Biol* **3**(10), 861-6.
- Johansson, M.W., Lye, M.H., Barthel, S.R., Duffy, A.K., Annis, D.S. & Mosher, D.F. (2004) Eosinophils adhere to vascular cell adhesion molecule-1 via podosomes. *Am J Respir Cell Mol Biol* **31**(4), 413-22.
- Johnson, G.L. & Lapadat, R. (2002) Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. *Science* **298**(5600), 1911-1912.
- Johnston, J.A., Bacon, C.M., Finbloom, D.S., Rees, R.C., Kaplan, D., Shibuya, K., Ortaldo, J.R., Gupta, S., Chen, Y.Q., Giri, J.D. & et al. (1995) Tyrosine phosphorylation and activation of STAT5, STAT3, and Janus kinases by interleukins 2 and 15. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(19), 8705-9.
- Jones, P.F., Jakubowicz, T. & Hemmings, B.A. (1991a) Molecular cloning of a second form of rac protein kinase. *Cell Regul* **2**(12), 1001-9.
- Jones, P.F., Jakubowicz, T., Pitossi, F.J., Maurer, F. & Hemmings, B.A. (1991b) Molecular cloning and identification of a serine/threonine protein kinase of the second-messenger subfamily. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**(10), 4171-5.
- Joneson, T. & Bar-Sagi, D. (1999) Suppression of Ras-induced apoptosis by the Rac GTPase. *Mol Cell Biol* **19**(9), 5892-901.
- Joneson, T., McDonough, M., Bar-Sagi, D. & Van Aelst, L. (1996) RAC regulation of actin polymerization and proliferation by a pathway distinct from Jun kinase. *Science* **274**(5291), 1374-6.
- Joyce, D., Bouzahzah, B., Fu, M., Albanese, C., D'Amico, M., Steer, J., Klein, J.U., Lee, R.J., Segall, J.E., Westwick, J.K., Der, C.J. & Pestell, R.G. (1999) Integration of Rac-dependent regulation of cyclin D1 transcription through a nuclear factor-kappaB-dependent pathway. *J Biol Chem* **274**(36), 25245-9.
- Just, I., Selzer, J., Wilm, M., von Eichel-Streiber, C., Mann, M. & Aktories, K. (1995) Glucosylation of Rho proteins by Clostridium difficile toxin B. *Nature* **375**(6531), 500-3.
- Kalesnikoff, J., Sly, L.M., Hughes, M.R., Buchse, T., Rauh, M.J., Cao, L.P., Lam, V., Mui, A., Huber, M. & Krystal, G. (2003) The role of SHIP in cytokine-induced signaling. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* **149**, 87-103.
- Kamata, T., Tieu, K.K., Irie, A., Springer, T.A. & Takada, Y. (2001) Amino acid residues in the α IIb subunit that are critical for ligand binding to

- integrin alpha Ibbeta 3 are clustered in the beta-propeller model. *J Biol Chem* **276**(47), 44275-83.
- Kanai, F., Liu, H., Field, S.J., Akbary, H., Matsuo, T., Brown, G.E., Cantley, L.C. & Yaffe, M.B.** (2001) The PX domains of p47phox and p40phox bind to lipid products of PI(3)K. *Nat Cell Biol* **3**(7), 675-8.
- Kane, L.P., Mollenauer, M.N., Xu, Z., Turck, C.W. & Weiss, A.** (2002a) Akt-dependent phosphorylation specifically regulates Cot induction of NF-kappa B-dependent transcription. *Molecular And Cellular Biology* **22**(16), 5962-5974.
- Kane, S., Sano, H., Liu, S.C., Asara, J.M., Lane, W.S., Garner, C.C. & Lienhard, G.E.** (2002b) A method to identify serine kinase substrates. Akt phosphorylates a novel adipocyte protein with a Rab GTPase-activating protein (GAP) domain. *J Biol Chem* **277**(25), 22115-8.
- Kang, H., Schneider, H. & Rudd, C.E.** (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.
- Kaniga, K., Uralil, J., Bliska, J.B. & Galan, J.E.** (1996) A secreted protein tyrosine phosphatase with modular effector domains in the bacterial pathogen *Salmonella typhimurium*. *Mol Microbiol* **21**(3), 633-41.
- Kanzaki, M., Furukawa, M., Raab, W. & Pessin, J.E.** (2004) Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate regulates adipocyte actin dynamics and GLUT4 vesicle recycling. *J Biol Chem* **279**(29), 30622-33.
- Karathanassis, D., Stahelin, R.V., Bravo, J., Perisic, O., Pacold, C.M., Cho, W. & Williams, R.L.** (2002) Binding of the PX domain of p47(phox) to phosphatidylinositol 3,4-bisphosphate and phosphatidic acid is masked by an intramolecular interaction. *Embo J* **21**(19), 5057-68.
- Karnoub, A.E., Worthylake, D.K., Rossman, K.L., Pruitt, W.M., Campbell, S.L., Sondek, J. & Der, C.J.** (2001) Molecular basis for Rac1 recognition by guanine nucleotide exchange factors. *Nat Struct Biol* **8**(12), 1037-41.
- Kato, T., Watanabe, N., Morishima, Y., Fujita, A., Ishizaki, T. & Narumiya, S.** (2001) Localization of a mammalian homolog of diaphanous, mDia1, to the mitotic spindle in HeLa cells. *J Cell Sci* **114**(Pt 4), 775-84.
- Katoh, H. & Negishi, M.** (2003) RhoG activates Rac1 by direct interaction with the Dock180-binding protein Elmo. *Nature* **424**(6947), 461-4.
- Katzav, S., Packham, G., Sutherland, M., Aroca, P., Santos, E. & Cleveland, J.L.** (1995) Vav and Ras induce fibroblast transformation by overlapping signaling pathways which require c-Myc function. *Oncogene* **11**(6), 1079-88.
- Kavanaugh, W.M., Pot, D.A., Chin, S.M., Deuter-Reinhard, M., Jefferson, A.B., Norris, F.A., Masiarz, F.R., Cousens, L.S., Majerus, P.W. & Williams, L.T.** (1996) Multiple forms of an inositol polyphosphate 5-phosphatase form signaling complexes with Shc and Grb2. *Curr Biol* **6**(4), 438-45.
- Kavanaugh, W.M. & Williams, L.T.** (1994) An alternative to SH2 domains for binding tyrosine-phosphorylated proteins. *Science* **266**(5192), 1862-5.
- Kawakami, Y., Nishimoto, H., Kitaura, J., Maeda-Yamamoto, M., Kato, R.M., Littman, D.R., Leitges, M., Rawlings, D.J. & Kawakami, T.** (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.
- Kawano, Y., Fukata, Y., Oshiro, N., Amano, M., Nakamura, T., Ito, M., Matsumura, F., Inagaki, M. & Kaibuchi, K.** (1999) Phosphorylation of myosin-binding subunit (MBS) of myosin phosphatase by Rho-kinase in vivo. *J Cell Biol* **147**(5), 1023-38.
- Keely, P.J., Westwick, J.K., Whitehead, I.P., Der, C.J. & Parise, L.V.** (1997) Cdc42 and Rac1 induce integrin-mediated cell motility and invasiveness through PI(3)K. *Nature* **390**(6660), 632-6.
- Keller, P.J., Gable, C.M., Wing, M.R. & Cox, A.D.** (2005) Rac3-mediated transformation requires multiple effector pathways. *Cancer Res* **65**(21), 9883-90.
- Kim, A.H., Khursigara, G., Sun, X., Franke, T.F. & Chao, M.V.** (2001a) Akt phosphorylates and negatively regulates apoptosis signal-regulating kinase 1. *Molecular And Cellular Biology* **21**(3), 893-901.
- Kim, A.H., Sasaki, T. & Chao, M.V.** (2003) JNK-interacting protein 1 promotes Akt1 activation. *J Biol Chem* **278**(32), 29830-6.
- Kim, C.H., Hango, G., Cooper, S., Helgason, C.D., Yew, S., Humphries, R.K., Krystal, G. & Broxmeyer, H.E.** (1999) Altered responsiveness to chemokines due to targeted disruption of SHIP. *J Clin Invest* **104**(12), 1751-9.
- Kim, D., Kim, S., Koh, H., Yoon, S.O., Chung, A.S., Cho, K.S. & Chung, J.** (2001b) Akt/PKB promotes cancer cell invasion via increased motility and metalloproteinase production. *Faseb J* **15**(11), 1953-62.
- Kim, O., Yang, J. & Qiu, Y.** (2002) Selective activation of small GTPase RhoA by tyrosine kinase Etk through its pleckstrin homology domain. *J Biol Chem* **277**(33), 30066-71.
- King, C.C., Gardiner, E.M., Zenke, F.T., Bohl, B.P., Newton, A.C., Hemmings, B.A. & Bokoch, G.M.** (2000) p21-activated kinase (PAK1) is phosphorylated and activated by 3-phosphoinositide-dependent kinase-1 (PDK1). *J Biol Chem* **275**(52), 41201-9.
- Kitamura, T., Kitamura, Y., Kuroda, S., Hino, Y., Ando, M., Kotani, K., Konishi, H., Matsuzaki, H., Kikkawa, U. & Ogawa et, a.** (1999) Insulin-induced phosphorylation and activation of cyclic nucleotide

- phosphodiesterase 3B by the serine-threonine kinase Akt. *Molecular And Cellular Biology* **19**(9), 6286-6296.
- Kiyokawa, E., Hashimoto, Y., Kurata, T., Sugimura, H. & Matsuda, M.** (1998) Evidence that DOCK180 up-regulates signals from the CrkII-p130(Cas) complex. *J Biol Chem* **273**(38), 24479-84.
- Klarlund, J.K., Rameh, L.E., Cantley, L.C., Buxton, J.M., Holik, J.J., Sakelis, C., Patki, V., Corvera, S. & Czech, M.P.** (1998) Regulation of GRP1-catalyzed ADP ribosylation factor guanine nucleotide exchange by phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate. *J Biol Chem* **273**(4), 1859-62.
- Klippel, A., Escobedo, J.A., Hu, Q. & Williams, L.T.** (1993) A region of the 85-kilodalton (kDa) subunit of phosphatidylinositol 3-kinase binds the 110-kDa catalytic subunit in vivo. *Mol Cell Biol* **13**(9), 5560-6.
- Knetsch, M.L., Schafers, N., Horstmann, H. & Manstein, D.J.** (2001) The Dictyostelium Bcr/Abr-related protein DRG regulates both Rac- and Rab-dependent pathways. *Embo J* **20**(7), 1620-9.
- Knighton, D.R., Zheng, J.H., Ten Eyck, L.F., Ashford, V.A., Xuong, N.H., Taylor, S.S. & Sowadski, J.M.** (1991) Crystal structure of the catalytic subunit of cyclic adenosine monophosphate-dependent protein kinase. *Science* **253**(5018), 407-14.
- Knobbe, C.B. & Reifenberger, G.** (2003) Genetic alterations and aberrant expression of genes related to the phosphatidyl-inositol-3'-kinase/protein kinase B (Akt) signal transduction pathway in glioblastomas. *Brain Pathol* **13**(4), 507-18.
- Kobayashi, T. & Cohen, P.** (1999) Activation of serum- and glucocorticoid-regulated protein kinase by agonists that activate phosphatidylinositide 3-kinase is mediated by 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 (PDK1) and PDK2. *Biochem J* **339** (Pt 2), 319-28.
- Kobayashi, T., Deak, M., Morrice, N. & Cohen, P.** (1999) Characterization of the structure and regulation of two novel isoforms of serum- and glucocorticoid-induced protein kinase. *Biochem J* **344** Pt 1, 189-97.
- Kodaki, T., Woscholski, R., Hallberg, B., Rodriguez-Viciana, P., Downward, J. & Parker, P.J.** (1994) The activation of phosphatidylinositol 3-kinase by Ras. *Curr Biol* **4**(9), 798-806.
- Kolanus, W., Nagel, W., Schiller, B., Zeitlmann, L., Godar, S., Stockinger, H. & Seed, B.** (1996) Alpha L beta 2 integrin/LFA-1 binding to ICAM-1 induced by cytohesin-1, a cytoplasmic regulatory molecule. *Cell* **86**(2), 233-42.
- Komalavilas, P., Mehta, S., Wingard, C.J., Dransfield, D.T., Bhalla, J., Woodrum, J.E., Molinaro, J.R. & Brophy, C.M.** (2001) PI3-kinase/Akt modulates vascular smooth muscle tone via cAMP signaling pathways. *J Appl Physiol* **91**(4), 1819-27.
- Komander, D., Fairservice, A., Deak, M., Kular, G.S., Prescott, A.R., Peter Downes, C., Safrany, S.T., Alessi, D.R. & van Aalten, D.M.** (2004) Structural insights into the regulation of PDK1 by phosphoinositides and inositol phosphates. *Embo J* **23**(20), 3918-28.
- Komatsu, S., Yano, T., Shibata, M., Tuft, R.A. & Ikebe, M.** (2000) Effects of the regulatory light chain phosphorylation of myosin II on mitosis and cytokinesis of mammalian cells. *J Biol Chem* **275**(44), 34512-20.
- Kondo, T. & Kahn, C.R.** (2004) Altered insulin signaling in retinal tissue in diabetic states. *J Biol Chem* **279**(36), 37997-8006.
- Konig, E.A., Kusser, W.C., Day, C., Porzolt, F., Glickman, B.W., Messer, G., Schmid, M., de Chatel, R., Marcsek, Z.L. & Demeter, J.** (2000) p53 mutations in hairy cell leukemia. *Leukemia* **14**(4), 706-11.
- Kontos, C.D., Stauffer, T.P., Yang, W.P., York, J.D., Huang, L., Blonar, M.A., Meyer, T. & Peters, K.G.** (1998) Tyrosine 1101 of Tie2 is the major site of association of p85 and is required for activation of phosphatidylinositol 3-kinase and Akt. *Mol Cell Biol* **18**(7), 4131-40.
- Kops, G.J., de Ruiter, N.D., De Vries-Smits, A.M., Powell, D.R., Bos, J.L. & Burgering, B.M.** (1999) Direct control of the Forkhead transcription factor AFX by protein kinase B. *Nature* **398**(6728), 630-634.
- Krall, R., Sun, J., Pederson, K.J. & Barbieri, J.T.** (2002) In vivo rho GTPase-activating protein activity of *Pseudomonas aeruginosa* cytotoxin ExoS. *Infect Immun* **70**(1), 360-7.
- Kraynov, V.S., Chamberlain, C., Bokoch, G.M., Schwartz, M.A., Slabaugh, S. & Hahn, K.M.** (2000) Localized Rac activation dynamics visualized in living cells. *Science* **290**(5490), 333-7.
- Kreck, M.L., Uhlinger, D.J., Tyagi, S.R., Inge, K.L. & Lambeth, J.D.** (1994) Participation of the small molecular weight GTP-binding protein Rac1 in cell-free activation and assembly of the respiratory burst oxidase. Inhibition by a carboxyl-terminal Rac peptide. *J Biol Chem* **269**(6), 4161-8.
- Kristelly, R., Gao, G. & Tesmer, J.J.** (2004) Structural determinants of RhoA binding and nucleotide exchange in leukemia-associated Rho guanine-nucleotide exchange factor. *J Biol Chem* **279**(45), 47352-62.
- Krystal, G.** (2000) Lipid phosphatases in the immune system. *Semin Immunol* **12**(4), 397-403.
- Krystal, G., Damen, J.E., Helgason, C.D., Huber, M., Hughes, M.R., Kalesnikoff, J., Lam, V., Rosten, P., Ware, M.D., Yew, S. & Humphries, R.K.** (1999) SHIPs ahoy. *Int J Biochem Cell Biol* **31**(10), 1007-10.
- Kubes, M., Cordier, J., Glowinski, J., Girault, J.A. & Chneiweiss, H.** (1998) Endothelin induces a calcium-dependent phosphorylation of PEA-15 in

- intact astrocytes: identification of Ser104 and Ser116 phosphorylated, respectively, by protein kinase C and calcium/calmodulin kinase II in vitro. *J Neurochem* **71**(3), 1307-14.
- Kumar, C.C. & Madison, V.** (2005) AKT crystal structure and AKT-specific inhibitors. *Oncogene* **24**(50), 7493-501.
- Kunstle, G., Laine, J., Pierron, G., Kagami Si, S., Nakajima, H., Hoh, F., Roumestand, C., Stern, M.H. & Noguchi, M.** (2002) Identification of Akt association and oligomerization domains of the Akt kinase coactivator TCL1. *Mol Cell Biol* **22**(5), 1513-25.
- Kuroda, S., Fukata, M., Nakagawa, M. & Kaibuchi, K.** (1999) Cdc42, Rac1, and their effector IQGAP1 as molecular switches for cadherin-mediated cell-cell adhesion. *Biochem Biophys Res Commun* **262**(1), 1-6.
- Kwon, T., Kwon, D.Y., Chun, J., Kim, J.H. & Kang, S.S.** (2000) Akt protein kinase inhibits Rac1-GTP binding through phosphorylation at serine 71 of Rac1. *J Biol Chem* **275**(1), 423-8.
- Lachyankar, M.B., Sultana, N., Schonhoff, C.M., Mitra, P., Poluha, W., Lambert, S., Quesenberry, P.J., Litofsky, N.S., Recht, L.D., Nabi, R., Miller, S.J., Ohta, S., Neel, B.G. & Ross, A.H.** (2000) A role for nuclear PTEN in neuronal differentiation. *J Neurosci* **20**(4), 1404-13.
- Lai, J.M., Wu, S., Huang, D.Y. & Chang, Z.F.** (2002) Cytosolic retention of phosphorylated extracellular signal-regulated kinase and a Rho-associated kinase-mediated signal impair expression of p21(Cip1/Waf1) in phorbol 12-myristate-13-acetate-induced apoptotic cells. *Mol Cell Biol* **22**(21), 7581-92.
- Laine, J., Kunstle, G., Obata, T. & Noguchi, M.** (2002) Differential regulation of Akt kinase isoforms by the members of the TCL1 oncogene family. *J Biol Chem* **277**(5), 3743-51.
- Laine, J., Kunstle, G., Obata, T., Sha, M. & Noguchi, M.** (2000) The protooncogene TCL1 is an Akt kinase coactivator. *Mol Cell* **6**(2), 395-407.
- Lamarche, N., Tapon, N., Stowers, L., Burbelo, P.D., Aspenstrom, P., Bridges, T., Chant, J. & Hall, A.** (1996) Rac and Cdc42 induce actin polymerization and G1 cell cycle progression independently of p65PAK and the JNK/SAPK MAP kinase cascade. *Cell* **87**(3), 519-29.
- Lanning, C.C., Daddona, J.L., Ruiz-Velasco, R., Shafer, S.H. & Williams, C.L.** (2004) The Rac1 C-terminal polybasic region regulates the nuclear localization and protein degradation of Rac1. *J Biol Chem* **279**(42), 44197-210.
- Laping, N.J., Grygielko, E., Mathur, A., Butter, S., Bomberger, J., Tweed, C., Martin, W., Fornwald, J., Lehr, R., Harling, J., Gaster, L., Callahan, J.F. & Olson, B.A.** (2002) Inhibition of transforming growth factor (TGF)-beta1-induced extracellular matrix with a novel inhibitor of the TGF-beta type I receptor kinase activity: SB-431542. *Mol Pharmacol* **62**(1), 58-64.
- Larance, M., Ramm, G., Stockli, J., van Dam, E.M., Winata, S., Wasinger, V., Simpson, F., Graham, M., Junutula, J.R., Guilhaus, M. & James, D.E.** (2005) Characterization of the role of the Rab GTPase-activating protein AS160 in insulin-regulated GLUT4 trafficking. *J Biol Chem* **280**(45), 37803-13.
- Law, D.A., Nannizzi-Alaimo, L. & Phillips, D.R.** (1996) Outside-in integrin signal transduction. Alpha IIb beta 3-(GP IIb IIIa) tyrosine phosphorylation induced by platelet aggregation. *J Biol Chem* **271**(18), 10811-5.
- Le Good, J.A., Ziegler, W.H., Parekh, D.B., Alessi, D.R., Cohen, P. & Parker, P.J.** (1998) Protein kinase C isotypes controlled by phosphoinositide 3-kinase through the protein kinase PDK1. *Science* **281**(5385), 2042-5.
- Lee, H.Y., Oh, S.H., Woo, J.K., Kim, W.Y., Van Pelt, C.S., Price, R.E., Cody, D., Tran, H., Pezzuto, J.M., Moriarty, R.M. & Hong, W.K.** (2005) Chemopreventive effects of deguelin, a novel Akt inhibitor, on tobacco-induced lung tumorigenesis. *J Natl Cancer Inst* **97**(22), 1695-9.
- Lee, J.O., Yang, H., Georgescu, M.M., Di Cristofano, A., Maehama, T., Shi, Y., Dixon, J.E., Pandolfi, P. & Pavletich, N.P.** (1999) Crystal structure of the PTEN tumor suppressor: implications for its phosphoinositide phosphatase activity and membrane association. *Cell* **99**(3), 323-34.
- Lee, M.H. & Yang, H.Y.** (2003) Regulators of G1 cyclin-dependent kinases and cancers. *Cancer Metastasis Rev* **22**(4), 435-49.
- Lee, S.R., Yang, K.S., Kwon, J., Lee, C., Jeong, W. & Rhee, S.G.** (2002) Reversible inactivation of the tumor suppressor PTEN by H₂O₂. *J Biol Chem* **277**(23), 20336-42.
- Legate, K.R., Montanez, E., Kudlacek, O. & Fassler, R.** (2006) ILK, PINCH and parvin: the tIPP of integrin signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**(1), 20-31.
- Lehto, V.P., Hovi, T., Vartio, T., Badley, R.A. & Virtanen, I.** (1982) Reorganization of cytoskeletal and contractile elements during transition of human monocytes into adherent macrophages. *Lab Invest* **47**(4), 391-9.
- Lemmon, M.A.** (2005) Pleckstrin homology domains: two halves make a hole? *Cell* **120**(5), 574-6.
- Lemmon, M.A. & Ferguson, K.M.** (2000) Signal-dependent membrane targeting by pleckstrin homology (PH) domains. *Biochem J* **350 Pt 1**, 1-18.
- Lemmon, M.A., Ferguson, K.M., O'Brien, R., Sigler, P.B. & Schlessinger, J.** (1995) Specific and high-affinity binding of inositol phosphates to an

- isolated pleckstrin homology domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(23), 10472-6.
- Leonard, W.J., Shores, E.W. & Love, P.E.** (1995) Role of the common cytokine receptor gamma chain in cytokine signaling and lymphoid development. *Immunol Rev* **148**, 97-114.
- Leslie, N.R., Bennett, D., Lindsay, Y.E., Stewart, H., Gray, A. & Downes, C.P.** (2003) Redox regulation of PI 3-kinase signalling via inactivation of PTEN. *Embo J* **22**(20), 5501-10.
- Leslie, N.R. & Downes, C.P.** (2004) PTEN function: how normal cells control it and tumour cells lose it. *Biochem J* **382**(Pt 1), 1-11.
- Leung, T., Chen, X.Q., Tan, I., Manser, E. & Lim, L.** (1998) Myotonic dystrophy kinase-related Cdc42-binding kinase acts as a Cdc42 effector in promoting cytoskeletal reorganization. *Mol Cell Biol* **18**(1), 130-40.
- Levav-Cohen, Y., Haupt, S. & Haupt, Y.** (2005) Mdm2 in growth signaling and cancer. *Growth Factors* **23**(3), 183-92.
- Li, L., Ernsting, B.R., Wishart, M.J., Lohse, D.L. & Dixon, J.E.** (1997a) A family of putative tumor suppressors is structurally and functionally conserved in humans and yeast. *J Biol Chem* **272**(47), 29403-6.
- Li, L., Gronning, L.M., Anderson, P.O., Li, S., Edvardsen, K., Johnston, J., Kioussis, D., Shepherd, P.R. & Wang, P.** (2004) Insulin induces SOCS-6 expression and its binding to the p85 monomer of phosphoinositide 3-kinase, resulting in improvement in glucose metabolism. *J Biol Chem* **279**(33), 34107-14.
- Li, X., Bu, X., Lu, B., Avraham, H., Flavell, R.A. & Lim, B.** (2002a) The hematopoiesis-specific GTP-binding protein RhoH is GTPase deficient and modulates activities of other Rho GTPases by an inhibitory function. *Mol Cell Biol* **22**(4), 1158-71.
- Li, Y., Dowbenko, D. & Lasky, L.A.** (2002b) AKT/PKB phosphorylation of p21Cip/WAF1 enhances protein stability of p21Cip/WAF1 and promotes cell survival. *J Biol Chem* **277**(13), 11352-61.
- Li, Z., Dong, X., Wang, Z., Liu, W., Deng, N., Ding, Y., Tang, L., Hla, T., Zeng, R., Li, L. & Wu, D.** (2005a) Regulation of PTEN by Rho small GTPases. *Nat Cell Biol* **7**(4), 399-404.
- Li, Z., Hannigan, M., Mo, Z., Liu, B., Lu, W., Wu, Y., Smrcka, A.V., Wu, G., Li, L., Liu, M., Huang, C.K. & Wu, D.** (2003) Directional sensing requires G beta gamma-mediated PAK1 and PIX alpha-dependent activation of Cdc42. *Cell* **114**(2), 215-27.
- Li, Z., Paik, J.H., Wang, Z., Hla, T. & Wu, D.** (2005b) Role of guanine nucleotide exchange factor P-Rex-2b in sphingosine 1-phosphate-induced Rac1 activation and cell migration in endothelial cells. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* **76**(1-4), 95-104.
- Li, Z., Wahl, M.I., Eguinoa, A., Stephens, L.R., Hawkins, P.T. & Witte, O.N.** (1997b) Phosphatidylinositol 3-kinase-gamma activates Bruton's tyrosine kinase in concert with Src family kinases. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(25), 13820-5.
- Liang, J., Zubovitz, J., Petrocelli, T., Kotchetkov, R., Connor, M.K., Han, K., Lee, J.-H., Ciarallo, S., Catzavelos, C. & Beniston et, a.** (2002) PKB/Akt phosphorylates p27, impairs nuclear import of p27 and opposes p27-mediated G1 arrest. *Nature Medicine* **8**(10), 1153-1160.
- Liepina, I., Czaplewski, C., Janmey, P. & Liwo, A.** (2003) Molecular dynamics study of a gelsolin-derived peptide binding to a lipid bilayer containing phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *Biopolymers* **71**(1), 49-70.
- Ligeti, E. & Settleman, J.** (2006) Regulation of RhoGAP specificity by phospholipids and prenylation. *Methods Enzymol* **406**, 104-17.
- Liliental, J. & Chang, D.D.** (1998) Rack1, a receptor for activated protein kinase C, interacts with integrin beta subunit. *J Biol Chem* **273**(4), 2379-83.
- Lin, C.W., Yan, F., Shimamura, S., Barg, S. & Shyng, S.L.** (2005) Membrane phosphoinositides control insulin secretion through their effects on ATP-sensitive K⁺ channel activity. *Diabetes* **54**(10), 2852-8.
- Lin, H.K., Yeh, S., Kang, H.Y. & Chang, C.** (2001) Akt suppresses androgen-induced apoptosis by phosphorylating and inhibiting androgen receptor. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America* **98**(13), 7200-7205.
- Lin, R., Bagrodia, S., Cerione, R. & Manor, D.** (1997) A novel Cdc42Hs mutant induces cellular transformation. *Curr Biol* **7**(10), 794-7.
- Linder, S. & Aepfelbacher, M.** (2003) Podosomes: adhesion hot-spots of invasive cells. *Trends Cell Biol* **13**(7), 376-85.
- Linder, S., Hufner, K., Wintergerst, U. & Aepfelbacher, M.** (2000) Microtubule-dependent formation of podosomal adhesion structures in primary human macrophages. *J Cell Sci* **113 Pt 23**, 4165-76.
- Linder, S., Nelson, D., Weiss, M. & Aepfelbacher, M.** (1999) Wiskott-Aldrich syndrome protein regulates podosomes in primary human macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(17), 9648-53.
- Lioubin, M.N., Algate, P.A., Tsai, S., Carlberg, K., Aebersold, A. & Rohrschneider, L.R.** (1996) p150Ship, a signal transduction molecule with inositol polyphosphate-5-phosphatase activity. *Genes Dev* **10**(9), 1084-95.
- Liu, A., Cerniglia, G.J., Bernhard, E.J. & Prendergast, G.C.** (2001a) RhoB is required to mediate apoptosis in neoplastically transformed cells after DNA damage. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(11), 6192-7.

- Liu, C.A., Wang, M.J., Chi, C.W., Wu, C.W. & Chen, J.Y. (2004) Rho/Rhotekin-mediated NF-kappaB activation confers resistance to apoptosis. *Oncogene* **23**(54), 8731-42.
- Liu, Q., Sasaki, T., Kozieradzki, I., Wakeham, A., Itie, A., Dumont, D.J. & Penninger, J.M. (1999) SHIP is a negative regulator of growth factor receptor-mediated PKB/Akt activation and myeloid cell survival. *Genes Dev* **13**(7), 786-91.
- Liu, S. & Ginsberg, M.H. (2000) Paxillin binding to a conserved sequence motif in the alpha 4 integrin cytoplasmic domain. *J Biol Chem* **275**(30), 22736-42.
- Liu, S., Slepak, M. & Ginsberg, M.H. (2001b) Binding of Paxillin to the alpha 9 Integrin Cytoplasmic Domain Inhibits Cell Spreading. *J Biol Chem* **276**(40), 37086-92.
- Liu, X., Wang, H., Eberstadt, M., Schnuchel, A., Olejniczak, E.T., Meadows, R.P., Schkeryantz, J.M., Janowick, D.A., Harlan, J.E., Harris, E.A., Staunton, D.E. & Fesik, S.W. (1998) *NMR structure and mutagenesis of the N-terminal Dbl homology domain of the nucleotide exchange factor Trio*.
- Lodish, H. (2004) *Molecular Biology of the Cell*.
- Loo, D.T., Kanner, S.B. & Aruffo, A. (1998) Filamin binds to the cytoplasmic domain of the beta1-integrin. Identification of amino acids responsible for this interaction. *J Biol Chem* **273**(36), 23304-12.
- Loucks, F.A., Le, S.S., Zimmermann, A.K., Ryan, K.R., Barth, H., Aktories, K. & Linseman, D.A. (2006) Rho family GTPase inhibition reveals opposing effects of mitogen-activated protein kinase kinase/extracellular signal-regulated kinase and Janus kinase/signal transducer and activator of transcription signaling cascades on neuronal survival. *J Neurochem* **97**(4), 957-67.
- Lu, D., Huang, J. & Basu, A. (2006) Protein kinase C-epsilon activates protein kinase B/AKT via DNA-PK to protect against TNF-induced cell death. *J Biol Chem*.
- Lu, M., Kinchen, J.M., Rossman, K.L., Grimsley, C., deBakker, C., Brugnera, E., Tosello-Trampont, A.C., Haney, L.B., Klingele, D., Sondek, J., Hengartner, M.O. & Ravichandran, K.S. (2004) PH domain of ELMO functions in trans to regulate Rac activation via Dock180. *Nat Struct Mol Biol* **11**(8), 756-62.
- Lu, M., Kinchen, J.M., Rossman, K.L., Grimsley, C., Hall, M., Sondek, J., Hengartner, M.O., Yajnik, V. & Ravichandran, K.S. (2005) A Steric-inhibition model for regulation of nucleotide exchange via the Dock180 family of GEFs. *Curr Biol* **15**(4), 371-7.
- Lu, M. & Ravichandran, K.S. (2006) Dock180-ELMO cooperation in Rac activation. *Methods Enzymol* **406**, 388-402.
- Lucas, D.M. & Rohrschneider, L.R. (1999) A novel spliced form of SH2-containing inositol phosphatase is expressed during myeloid development. *Blood* **93**(6), 1922-33.
- Luo, J., Field, S.J., Lee, J.Y., Engelman, J.A. & Cantley, L.C. (2005a) The p85 regulatory subunit of phosphoinositide 3-kinase down-regulates IRS-1 signaling via the formation of a sequestration complex. *J Cell Biol* **170**(3), 455-64.
- Luo, Y., Shoemaker, A.R., Liu, X., Woods, K.W., Thomas, S.A., de Jong, R., Han, E.K., Li, T., Stoll, V.S., Powlas, J.A., Oleksijew, A., Mitten, M.J., Shi, Y., Guan, R., McGonigal, T.P., Klinghofer, V., Johnson, E.F., Levenson, J.D., Bouska, J.J., Mamo, M., Smith, R.A., Gramling-Evans, E.E., Zinker, B.A., Mika, A.K., Nguyen, P.T., Oltersdorf, T., Rosenberg, S.H., Li, Q. & Giranda, V.L. (2005b) Potent and selective inhibitors of Akt kinases slow the progress of tumors in vivo. *Mol Cancer Ther* **4**(6), 977-86.
- Luo, Y., Smith, R.A., Guan, R., Liu, X., Klinghofer, V., Shen, J., Hutchins, C., Richardson, P., Holzman, T., Rosenberg, S.H. & Giranda, V.L. (2004) Pseudosubstrate peptides inhibit Akt and induce cell growth inhibition. *Biochemistry* **43**(5), 1254-63.
- Lynch, D.K., Ellis, C.A., Edwards, P.A. & Hiles, I.D. (1999) Integrin-linked kinase regulates phosphorylation of serine 473 of protein kinase B by an indirect mechanism. *Oncogene* **18**(56), 8024-32.
- Ma, Y.Y., Wei, S.J., Lin, Y.C., Lung, J.C., Chang, T.C., Whang-Peng, J., Liu, J.M., Yang, D.M., Yang, W.K. & Shen, C.Y. (2000) PIK3CA as an oncogene in cervical cancer. *Oncogene* **19**(23), 2739-44.
- Madrid, L.V., Mayo, M.W., Reuther, J.Y. & Baldwin, A.S., Jr. (2001) Akt stimulates the transactivation potential of the RelA/p65 Subunit of NF-kappa B through utilization of the Ikappa B kinase and activation of the mitogen-activated protein kinase p38. *The Journal Of Biological Chemistry* **276**(22), 18934-18940.
- Madrid, L.V., Wang, C.Y., Guttridge, D.C., Schottelius, A.J., Baldwin, A.S., Jr. & Mayo, M.W. (2000) Akt suppresses apoptosis by stimulating the transactivation potential of the RelA/p65 subunit of NF-kappaB. *Molecular And Cellular Biology* **20**(5), 1626-1638.
- Maehama, T., Taylor, G.S. & Dixon, J.E. (2001) PTEN and myotubularin: novel phosphoinositide phosphatases. *Annu Rev Biochem* **70**, 247-79.
- Maesaki, R., Shimizu, T., Ihara, K., Kuroda, S., Kaibuchi, K. & Hakoshima, T. (1999) Biochemical and crystallographic characterization of a Rho effector domain of the protein serine/threonine kinase N in a complex with RhoA. *J Struct Biol* **126**(2), 166-70.
- Mahimainathan, L. & Choudhury, G.G. (2004) Inactivation of platelet-derived growth factor receptor by the tumor suppressor PTEN provides a novel

- mechanism of action of the phosphatase. *J Biol Chem* **279**(15), 15258-68.
- Maira, S.M., Galetic, I., Brazil, D.P., Kaech, S., Ingle, E., Thelen, M. & Hemmings, B.A.** (2001) Carboxyl-terminal modulator protein (CTMP), a negative regulator of PKB/Akt and v-Akt at the plasma membrane. *Science* **294**(5541), 374-80.
- Majno, G. & Joris, I.** (1995) Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *Am J Pathol* **146**(1), 3-15.
- Malecz, N., McCabe, P.C., Spaargaren, C., Qiu, R., Chuang, Y. & Symons, M.** (2000) Synaptojanin 2, a novel Rac1 effector that regulates clathrin-mediated endocytosis. *Curr Biol* **10**(21), 1383-6.
- Manning, B.D., Tee, A.R., Logsdon, M.N., Blenis, J. & Cantley, L.C.** (2002) Identification of the Tuberous Sclerosis Complex-2 Tumor Suppressor Gene Product Tuberin as a Target of the Phosphoinositide 3-Kinase/Akt Pathway. *Molecular Cell* **10**(1), 151-162.
- Marchisio, P.C., Cirillo, D., Naldini, L., Primavera, M.V., Teti, A. & Zamboni-Zallone, A.** (1984) Cell-substratum interaction of cultured avian osteoclasts is mediated by specific adhesion structures. *J Cell Biol* **99**(5), 1696-705.
- Marsin, A.S., Bertrand, L., Rider, M.H., Deprez, J., Beauloye, C., Vincent, M.F., Van den Berghe, G., Carling, D. & Hue, L.** (2000) Phosphorylation and activation of heart PFK-2 by AMPK has a role in the stimulation of glycolysis during ischaemia. *Current Biology* **10**(20), 1247-1255.
- Marte, B.M., Rodriguez-Viciano, P., Wennstrom, S., Warne, P.H. & Downward, J.** (1997) R-Ras can activate the phosphoinositide 3-kinase but not the MAP kinase arm of the Ras effector pathways. *Curr Biol* **7**(1), 63-70.
- Martel, V., Racaud-Sultan, C., Dupe, S., Marie, C., Paulhe, F., Galmiche, A., Block, M.R. & Albiges-Rizo, C.** (2001) Conformation, localization, and integrin binding of talin depend on its interaction with phosphoinositides. *J Biol Chem* **276**(24), 21217-27.
- Martin, M.B., Franke, T.F., Stoica, G.E., Chambon, P., Katzenellenbogen, B.S., Stoica, B.A., McLemore, M.S., Olivo, S.E. & Stoica, A.** (2000) A role for Akt in mediating the estrogenic functions of epidermal growth factor and insulin-like growth factor I. *Endocrinology* **141**(12), 4503-11.
- Martin, T.F.** (1998) Phosphoinositide lipids as signaling molecules: common themes for signal transduction, cytoskeletal regulation, and membrane trafficking. *Annu Rev Cell Dev Biol* **14**, 231-64.
- Martinez-Lorenzo, M.J., Anel, A., Monleon, I., Sierra, J.J., Pineiro, A., Naval, J. & Alava, M.A.** (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.
- Massol, P., Montcourrier, P., Guillemot, J.C. & Chavrier, P.** (1998) Fc receptor-mediated phagocytosis requires CDC42 and Rac1. *Embo J* **17**(21), 6219-29.
- Matsui, T., Yonemura, S., Tsukita, S. & Tsukita, S.** (1999) Activation of ERM proteins in vivo by Rho involves phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase and not ROCK kinases. *Curr Biol* **9**(21), 1259-62.
- May, R.C., Caron, E., Hall, A. & Machesky, L.M.** (2000) Involvement of the Arp2/3 complex in phagocytosis mediated by FcγRIII or CR3. *Nat Cell Biol* **2**(4), 246-8.
- Mayo, L.D. & Donner, D.B.** (2001) A phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway promotes translocation of Mdm2 from the cytoplasm to the nucleus. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America* **98**(20), 11598-11603.
- McGill, G., Shimamura, A., Bates, R.C., Savage, R.E. & Fisher, D.E.** (1997) Loss of matrix adhesion triggers rapid transformation-selective apoptosis in fibroblasts. *J Cell Biol* **138**(4), 901-11.
- Meacci, E., Tsai, S.C., Adamik, R., Moss, J. & Vaughan, M.** (1997) Cytohesin-1, a cytosolic guanine nucleotide-exchange protein for ADP-ribosylation factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(5), 1745-8.
- Mehenni, H., Lin-Marq, N., Buchet-Poyau, K., Reymond, A., Collart, M.A., Picard, D. & Antonarakis, S.E.** (2005) LKB1 interacts with and phosphorylates PTEN: a functional link between two proteins involved in cancer predisposing syndromes. *Hum Mol Genet* **14**(15), 2209-19.
- Mehrotra, B., Myszka, D.G. & Prestwich, G.D.** (2000) Binding kinetics and ligand specificity for the interactions of the C2B domain of synaptogmin II with inositol polyphosphates and phosphoinositides. *Biochemistry* **39**(32), 9679-86.
- Mehta, D., Rahman, A. & Malik, A.B.** (2001) Protein kinase C-α signals rho-guanine nucleotide dissociation inhibitor phosphorylation and rho activation and regulates the endothelial cell barrier function. *J Biol Chem* **276**(25), 22614-20.
- Mejillano, M., Yamamoto, M., Rozelle, A.L., Sun, H.Q., Wang, X. & Yin, H.L.** (2001) Regulation of apoptosis by phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate inhibition of caspases, and caspase inactivation of phosphatidylinositol phosphate 5-kinases. *J Biol Chem* **276**(3), 1865-72.
- Meller, N., Irani-Tehrani, M., Kiosses, W.B., Del Pozo, M.A. & Schwartz, M.A.** (2002) Zizimin1, a novel Cdc42 activator, reveals a new GEF domain for Rho proteins. *Nat Cell Biol* **4**(9), 639-47.
- Mercieca, J., Matutes, E., Moskovic, E., MacLennan, K., Matthey, F., Costello, C., Behrens, J., Basu, S., Roath, S., Fairhead, S. & et al.** (1992) Massive abdominal lymphadenopathy in hairy cell

- leukaemia: a report of 12 cases. *Br J Haematol* **82**(3), 547-54.
- Meredith, J.E., Jr., Fazeli, B. & Schwartz, M.A.** (1993) The extracellular matrix as a cell survival factor. *Mol Biol Cell* **4**(9), 953-61.
- Merlot, S. & Firtel, R.A.** (2003) Leading the way: Directional sensing through phosphatidylinositol 3-kinase and other signaling pathways. *J Cell Sci* **116**(Pt 17), 3471-8.
- Mettouchi, A., Klein, S., Guo, W., Lopez-Lago, M., Lemichez, E., Westwick, J.K. & Giancotti, F.G.** (2001) Integrin-specific activation of Rac controls progression through the G(1) phase of the cell cycle. *Mol Cell* **8**(1), 115-27.
- Michaelson, D., Silletti, J., Murphy, G., D'Eustachio, P., Rush, M. & Philips, M.R.** (2001) Differential localization of Rho GTPases in live cells: regulation by hypervariable regions and RhoGDI binding. *J Cell Biol* **152**(1), 111-26.
- Michalevicz, R. & Revel, M.** (1987) Interferons regulate the in vitro differentiation of multilineage lympho-myeloid stem cells in hairy cell leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**(8), 2307-11.
- Michell, B.J., Griffiths, J.E., Mitchelhill, K.I., Rodriguez-Crespo, I., Tiganis, T., Bozinovski, S., de Montellano, P.R.O., Kemp, B.E. & Pearson, R.B.** (1999) The Akt kinase signals directly to endothelial nitric oxide synthase. *Current Biology* **9**(15), 845-848.
- Michell, R.H.** (1975) Inositol phospholipids and cell surface receptor function. *Biochim Biophys Acta* **415**(1), 81-47.
- Michiels, F. & Collard, J.G.** (1999) Rho-like GTPases: their role in cell adhesion and invasion. *Biochem Soc Symp* **65**, 125-46.
- Michiels, F., Habets, G.G., Stam, J.C., van der Kammen, R.A. & Collard, J.G.** (1995) A role for Rac in Tiam1-induced membrane ruffling and invasion. *Nature* **375**(6529), 338-40.
- Michishita, M., Videm, V. & Arnaout, M.A.** (1993) A novel divalent cation-binding site in the A domain of the beta 2 integrin CR3 (CD11b/CD18) is essential for ligand binding. *Cell* **72**(6), 857-67.
- Miinea, C.P., Sano, H., Kane, S., Sano, E., Fukuda, M., Peranen, J., Lane, W.S. & Lienhard, G.E.** (2005) AS160, the Akt substrate regulating GLUT4 translocation, has a functional Rab GTPase-activating protein domain. *Biochem J* **391**(Pt 1), 87-93.
- Milburn, C.C., Deak, M., Kelly, S.M., Price, N.C., Alessi, D.R. & Van Aalten, D.M.** (2003) Binding of phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate to the pleckstrin homology domain of protein kinase B induces a conformational change. *Biochem J* **375**(Pt 3), 531-8.
- Millard, T.H., Sharp, S.J. & Machesky, L.M.** (2004) Signalling to actin assembly via the WASP (Wiskott-Aldrich syndrome protein)-family proteins and the Arp2/3 complex. *Biochem J* **380**(Pt 1), 1-17.
- Minoshima, Y., Kawashima, T., Hirose, K., Tonozuka, Y., Kawajiri, A., Bao, Y.C., Deng, X., Tatsuka, M., Narumiya, S., May, W.S., Jr., Nosaka, T., Semba, K., Inoue, T., Satoh, T., Inagaki, M. & Kitamura, T.** (2003) Phosphorylation by aurora B converts MgcRacGAP to a RhoGAP during cytokinesis. *Dev Cell* **4**(4), 549-60.
- Miralles, F., Posern, G., Zaromytidou, A.I. & Treisman, R.** (2003) Actin dynamics control SRF activity by regulation of its coactivator MAL. *Cell* **113**(3), 329-42.
- Montaner, S., Perona, R., Saniger, L. & Lacal, J.C.** (1998) Multiple signalling pathways lead to the activation of the nuclear factor kappaB by the Rho family of GTPases. *J Biol Chem* **273**(21), 12779-85.
- Moon, S.Y. & Zheng, Y.** (2003) Rho GTPase-activating proteins in cell regulation. *Trends Cell Biol* **13**(1), 13-22.
- Mora, A., Komander, D., van Aalten, D.M. & Alessi, D.R.** (2004) PDK1, the master regulator of AGC kinase signal transduction. *Semin Cell Dev Biol* **15**(2), 161-70.
- Moreau, V., Tatin, F., Varon, C. & Genot, E.** (2003) Actin can reorganize into podosomes in aortic endothelial cells, a process controlled by Cdc42 and RhoA. *Mol Cell Biol* **23**(19), 6809-22.
- Moskwa, P., Paclet, M.H., Dagher, M.C. & Ligeti, E.** (2005) Autoinhibition of p50 Rho GTPase-activating protein (GAP) is released by prenylated small GTPases. *J Biol Chem* **280**(8), 6716-20.
- Motti, M.L., De Marco, C., Califano, D., Fusco, A. & Viglietto, G.** (2004) Akt-dependent T198 phosphorylation of cyclin-dependent kinase inhibitor p27kip1 in breast cancer. *Cell Cycle* **3**(8), 1074-80.
- Muraille, E., Bruhns, P., Pesesse, X., Daeron, M. & Erneux, C.** (2000) The SH2 domain containing inositol 5-phosphatase SHIP2 associates to the immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif of Fc gammaRIIB in B cells under negative signaling. *Immunol Lett* **72**(1), 7-15.
- Murakami, T., Takagi, H., Suzuma, K., Suzuma, I., Ohashi, H., Watanabe, D., Ojima, T., Suganami, E., Kurimoto, M., Kaneto, H., Honda, Y. & Yoshimura, N.** (2005) Angiotensin-1 attenuates H2O2-induced SEK1/JNK phosphorylation through the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway in vascular endothelial cells. *J Biol Chem* **280**(36), 31841-9.
- Murga, C., Zohar, M., Teramoto, H. & Gutkind, J.S.** (2002) Rac1 and RhoG promote cell survival by the activation of PI3K and Akt, independently of their ability to stimulate JNK and NF-kappaB. *Oncogene* **21**(2), 207-16.
- Murphy, C., Saffrich, R., Grummt, M., Gournier, H., Rybin, V., Rubino, M., Auvinen, P., Lutcke, A.,**

- Parton, R.G. & Zerial, M.** (1996) Endosome dynamics regulated by a Rho protein. *Nature* **384**(6608), 427-32.
- Murphy, G.A., Solski, P.A., Jillian, S.A., Perez de la Ossa, P., D'Eustachio, P., Der, C.J. & Rush, M.G.** (1999) Cellular functions of TC10, a Rho family GTPase: regulation of morphology, signal transduction and cell growth. *Oncogene* **18**(26), 3831-45.
- Murthy, S.S., Tosolini, A., Taguchi, T. & Testa, J.R.** (2000) Mapping of AKT3, encoding a member of the Akt/protein kinase B family, to human and rodent chromosomes by fluorescence in situ hybridization. *Cytogenet Cell Genet* **88**(1-2), 38-40.
- Musacchio, A., Cantley, L.C. & Harrison, S.C.** (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.
- Myers, M.P., Pass, I., Batty, I.H., Van der Kaay, J., Stolarov, J.P., Hemmings, B.A., Wigler, M.H., Downes, C.P. & Tonks, N.K.** (1998) The lipid phosphatase activity of PTEN is critical for its tumor suppressor function. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(23), 13513-8.
- Myers, M.P., Stolarov, J.P., Eng, C., Li, J., Wang, S.L., Wigler, M.H., Parsons, R. & Tonks, N.K.** (1997) P-TEN, the tumor suppressor from human chromosome 10q23, is a dual-specificity phosphatase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(17), 9052-7.
- Mzali, R., Seguin, L., Liot, C., Auger, A., Pacaud, P., Loirand, G., Thibault, C., Pierre, J. & Bertoglio, J.** (2005) Regulation of Rho signaling pathways in interleukin-2-stimulated human T-lymphocytes. *Faseb J* **19**(13), 1911-3.
- Nakahara, H., Howard, L., Thompson, E.W., Sato, H., Seiki, M., Yeh, Y. & Chen, W.T.** (1997) Transmembrane/cytoplasmic domain-mediated membrane type 1-matrix metalloprotease docking to invadopodia is required for cell invasion. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(15), 7959-64.
- Nakamura, T.M. & Cech, T.R.** (1998) Reversing Time: Origin of Telomerase. *Cell* **92**(5), 587-590.
- Nakatani, K., Sakaue, H., Thompson, D.A., Weigel, R.J. & Roth, R.A.** (1999) Identification of a human Akt3 (protein kinase B gamma) which contains the regulatory serine phosphorylation site. *Biochem Biophys Res Commun* **257**(3), 906-10.
- Narumiya, S., Oceguera-Yanez, F. & Yasuda, S.** (2004) A new look at Rho GTPases in cell cycle: role in kinetochore-microtubule attachment. *Cell Cycle* **3**(7), 855-7.
- Nave, B.T., Ouwens, M., Withers, D.J., Alessi, D.R. & Shepherd, P.R.** (1999) Mammalian target of rapamycin is a direct target for protein kinase B: identification of a convergence point for opposing effects of insulin and amino-acid deficiency on protein translation. *The Biochemical Journal* **344**(Part 2), 427-431.
- Neudauer, C.L., Joberty, G., Tatsis, N. & Macara, I.G.** (1998) Distinct cellular effects and interactions of the Rho-family GTPase TC10. *Curr Biol* **8**(21), 1151-60.
- Nho, R.S., Xia, H., Kahm, J., Kleidon, J., Diebold, D. & Henke, C.A.** (2005) Role of integrin-linked kinase in regulating phosphorylation of Akt and fibroblast survival in type I collagen matrices through a beta1 integrin viability signaling pathway. *J Biol Chem* **280**(28), 26630-9.
- Niggli, V.** (2001) Structural properties of lipid-binding sites in cytoskeletal proteins. *Trends Biochem Sci* **26**(10), 604-11.
- Nimnual, A.S., Taylor, L.J. & Bar-Sagi, D.** (2003) Redox-dependent downregulation of Rho by Rac. *Nat Cell Biol* **5**(3), 236-41.
- Nishida, K., Kaziro, Y. & Satoh, T.** (1999) Anti-apoptotic function of Rac in hematopoietic cells. *Oncogene* **18**(2), 407-15.
- Nishikimi, A., Meller, N., Uekawa, N., Isobe, K., Schwartz, M.A. & Maruyama, M.** (2005) Zizimin2: a novel, DOCK180-related Cdc42 guanine nucleotide exchange factor expressed predominantly in lymphocytes. *FEBS Lett* **579**(5), 1039-46.
- Nishizuka, Y.** (1988) The molecular heterogeneity of protein kinase C and its implications for cellular regulation. *Nature* **334**(6184), 661-5.
- Nisimoto, Y., Freeman, J.L., Motalebi, S.A., Hirshberg, M. & Lambeth, J.D.** (1997) Rac binding to p67(phox). Structural basis for interactions of the Rac1 effector region and insert region with components of the respiratory burst oxidase. *J Biol Chem* **272**(30), 18834-41.
- Nobes, C.D. & Hall, A.** (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.
- Nobes, C.D. & Hall, A.** (1999) Rho GTPases control polarity, protrusion, and adhesion during cell movement. *J Cell Biol* **144**(6), 1235-44.
- Nobes, C.D., Lauritzen, I., Mattei, M.G., Paris, S., Hall, A. & Chardin, P.** (1998) A new member of the Rho family, Rnd1, promotes disassembly of actin filament structures and loss of cell adhesion. *J Cell Biol* **141**(1), 187-97.
- Nojima, Y., Morino, N., Mimura, T., Hamasaki, K., Furuya, H., Sakai, R., Sato, T., Tachibana, K., Morimoto, C., Yazaki, Y. & 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**(25), 15398-402.
- Nolte, R.T., Eck, M.J., Schlessinger, J., Shoelson, S.E. & Harrison, S.C.** (1996) Crystal structure of the

- PI 3-kinase p85 amino-terminal SH2 domain and its phosphopeptide complexes. *Nat Struct Biol* **3**(4), 364-74.
- Noritake, J., Fukata, M., Sato, K., Nakagawa, M., Watanabe, T., Izumi, N., Wang, S., Fukata, Y. & Kaibuchi, K.** (2004) Positive role of IQGAP1, an effector of Rac1, in actin-meshwork formation at sites of cell-cell contact. *Mol Biol Cell* **15**(3), 1065-76.
- Notredame, C., Higgins, D.G. & Heringa, J.** (2000) T-Coffee: A novel method for fast and accurate multiple sequence alignment. *J Mol Biol* **302**(1), 205-17.
- O'Brien, R., Rugman, P., Renzoni, D., Layton, M., Handa, R., Hilyard, K., Waterfield, M.D., Driscoll, P.C. & Ladbury, J.E.** (2000) Alternative modes of binding of proteins with tandem SH2 domains. *Protein Sci* **9**(3), 570-9.
- Ohashi, K., Nagata, K., Maekawa, M., Ishizaki, T., Narumiya, S. & Mizuno, K.** (2000) Rho-associated kinase ROCK activates LIM-kinase 1 by phosphorylation at threonine 508 within the activation loop. *J Biol Chem* **275**(5), 3577-82.
- Ohta, Y., Hartwig, J.H. & Stossel, T.P.** (2006) FilGAP, a Rho- and ROCK-regulated GAP for Rac binds filamin A to control actin remodelling. *Nat Cell Biol* **8**(8), 803-14.
- Ojala, P.J., Paavilainen, V. & Lappalainen, P.** (2001) Identification of yeast cofilin residues specific for actin monomer and PIP2 binding. *Biochemistry* **40**(51), 15562-9.
- Okkenhaug, K. & Vanhaesebroeck, B.** (2001) New responsibilities for the PI3K regulatory subunit p85 alpha. *Sci STKE* **2001**(65), PE1.
- Olazabal, I.M., Caron, E., May, R.C., Schilling, K., Knecht, D.A. & Machesky, L.M.** (2002) Rho-kinase and myosin-II control phagocytic cup formation during CR, but not FcgammaR, phagocytosis. *Curr Biol* **12**(16), 1413-18.
- Olski, T.M., Noegel, A.A. & Korenbaum, E.** (2001) Parvin, a 42 kDa focal adhesion protein, related to the alpha-actinin superfamily. *J Cell Sci* **114**(Pt 3), 525-38.
- Olson, M.F., Ashworth, A. & Hall, A.** (1995) An essential role for Rho, Rac, and Cdc42 GTPases in cell cycle progression through G1. *Science* **269**(5228), 1270-2.
- Ono, M., Okada, H., Bolland, S., Yanagi, S., Kurosaki, T. & Ravetch, J.V.** (1997) Deletion of SHIP or SHP-1 reveals two distinct pathways for inhibitory signaling. *Cell* **90**(2), 293-301.
- Ory, S., Munari-Silem, Y., Fort, P. & Jurdic, P.** (2000) Rho and Rac exert antagonistic functions on spreading of macrophage-derived multinucleated cells and are not required for actin fiber formation. *J Cell Sci* **113** (Pt 7), 1177-88.
- Osiak, A.E., Zenner, G. & Linder, S.** (2005) Subconfluent endothelial cells form podosomes downstream of cytokine and RhoGTPase signaling. *Exp Cell Res.*
- Otsu, M., Hiles, I., Gout, I., Fry, M.J., Ruiz-Larrea, F., Panayotou, G., Thompson, A., Dhand, R., Hsuan, J., Totty, N. & 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., Sun, H., Kerfant, B.G., Crackower, M.A., Penninger, J.M. & Backx, P.H.** (2004) The role of phosphoinositide-3 kinase and PTEN in cardiovascular physiology and disease. *J Mol Cell Cardiol* **37**(2), 449-71.
- Overduin, M., Cheever, M.L. & Kutateladze, T.G.** (2001) Signaling with phosphoinositides: better than binary. *Mol Interv* **1**(3), 150-9.
- Oxvig, C. & Springer, T.A.** (1998) Experimental support for a beta-propeller domain in integrin alpha-subunits and a calcium binding site on its lower surface. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(9), 4870-5.
- Ozes, O.N., Mayo, L.D., Gustin, J.A., Pfeffer, S.R., Pfeffer, L.M. & Donner, D.B.** (1999) NF-kappaB activation by tumour necrosis factor requires the Akt serine-threonine kinase. *Nature* **401**(6748), 82-85.
- Paduch, M., Jelen, F. & Otlewski, J.** (2001) Structure of small G proteins and their regulators. *Acta Biochim Pol* **48**(4), 829-50.
- Paganelli, K.A., Evans, S.S., Han, T. & Ozer, H.** (1986) B cell growth factor-induced proliferation of hairy cell lymphocytes and inhibition by type I interferon in vitro. *Blood* **67**(4), 937-42.
- Paramio, J.M., Segrelles, C., Ruiz, S. & Jorcano, J.L.** (2001) Inhibition of protein kinase B (PKB) and PKCzeta mediates keratin K10-induced cell cycle arrest. *Mol Cell Biol* **21**(21), 7449-59.
- Parekh, D.B., Katso, R.M., Leslie, N.R., Downes, C.P., Procyk, K.J., Waterfield, M.D. & Parker, P.J.** (2000) Beta1-integrin and PTEN control the phosphorylation of protein kinase C. *Biochem J* **352** Pt 2, 425-33.
- Park, H.-S., Kim, M.-S., Huh, S.-H., Park, J., Chung, J., Kang, S.S. & Choi, E.-J.** (2002) Akt (protein kinase B) negatively regulates SEK1 by means of protein phosphorylation. *The Journal Of Biological Chemistry* **277**(4), 2573-2578.
- Partovian, C. & Simons, M.** (2004) Regulation of protein kinase B/Akt activity and Ser473 phosphorylation by protein kinase Calpha in endothelial cells. *Cell Signal* **16**(8), 951-7.
- Paternotte, N., Zhang, J., Vandenbroere, I., Backers, K., Blero, D., Kioka, N., Vanderwinden, J.M., Pirson, I. & Erneux, C.** (2005) SHIP2 interaction with the cytoskeletal protein Vinexin. *Febs J* **272**(23), 6052-66.

- Patki, V., Lawe, D.C., Corvera, S., Virbasius, J.V. & Chawla, A.** (1998) A functional PtdIns(3)P-binding motif. *Nature* **394**(6692), 433-4.
- Pavalko, F.M., Chen, N.X., Turner, C.H., Burr, D.B., Atkinson, S., Hsieh, Y.F., Qiu, J. & Duncan, R.L.** (1998) Fluid shear-induced mechanical signaling in MC3T3-E1 osteoblasts requires cytoskeleton-integrin interactions. *Am J Physiol* **275**(6 Pt 1), C1591-601.
- Peck, G.R., Ye, S., Pham, V., Fernando, R.N., Lance Macaulay, S., Yeen Chai, S. & Albiston, A.L.** (2006) Interaction of the Akt substrate, AS160, with the GLUT4 vesicle marker protein, IRAP. *Mol Endocrinol*.
- Pekarsky, Y., Koval, A., Hallas, C., Bichi, R., Tresini, M., Malstrom, S., Russo, G., Tschlis, P. & Croce, C.M.** (2000) Tcl1 enhances Akt kinase activity and mediates its nuclear translocation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(7), 3028-33.
- Pendaries, C., Tronchere, H., Arbibe, L., Mounier, J., Gozani, O., Cantley, L., Fry, M.J., Gaits-Iacovoni, F., Sansonetti, P.J. & Payrastra, B.** (2006) PtdIns5P activates the host cell PI3-kinase/Akt pathway during *Shigella flexneri* infection. *Embo J* **25**(5), 1024-34.
- Peng, X.D., Xu, P.Z., Chen, M.L., Hahn-Windgassen, A., Skeen, J., Jacobs, J., Sundararajan, D., Chen, W.S., Crawford, S.E., Coleman, K.G. & Hay, N.** (2003) Dwarfism, impaired skin development, skeletal muscle atrophy, delayed bone development, and impeded adipogenesis in mice lacking Akt1 and Akt2. *Genes Dev* **17**(11), 1352-65.
- Perona, R., Montaner, S., Saniger, L., Sanchez-Perez, I., Bravo, R. & Lacal, J.C.** (1997) Activation of the nuclear factor-kappaB by Rho, CDC42, and Rac-1 proteins. *Genes Dev* **11**(4), 463-75.
- Pervaiz, S., Cao, J., Chao, O.S., Chin, Y.Y. & Clement, M.V.** (2001) Activation of the RacGTPase inhibits apoptosis in human tumor cells. *Oncogene* **20**(43), 6263-8.
- Pesesse, X., Deleu, S., De Smedt, F., Drayer, L. & Erneux, C.** (1997) Identification of a second SH2-domain-containing protein closely related to the phosphatidylinositol polyphosphate 5-phosphatase SHIP. *Biochem Biophys Res Commun* **239**(3), 697-700.
- Pesesse, X., Dewaste, V., De Smedt, F., Laffargue, M., Giuriato, S., Moreau, C., Payrastra, B. & Erneux, C.** (2001) The Src homology 2 domain containing inositol 5-phosphatase SHIP2 is recruited to the epidermal growth factor (EGF) receptor and dephosphorylates phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate in EGF-stimulated COS-7 cells. *J Biol Chem* **276**(30), 28348-55.
- Peterson, A.J., Kyba, M., Bornemann, D., Morgan, K., Brock, H.W. & Simon, J.** (1997) A domain shared by the Polycomb group proteins Scm and ph mediates heterotypic and homotypic interactions. *Mol Cell Biol* **17**(11), 6683-92.
- Peterson, F.C., Penkert, R.R., Volkman, B.F. & Prehoda, K.E.** (2004) Cdc42 regulates the Par-6 PDZ domain through an allosteric CRIB-PDZ transition. *Mol Cell* **13**(5), 665-76.
- Petruzzelli, L., Takami, M. & Humes, H.D.** (1999) Structure and function of cell adhesion molecules. *Am J Med* **106**(4), 467-76.
- Pettitt, A.R., Zuzel, M. & Cawley, J.C.** (1999) Hairy-cell leukaemia: biology and management. *Br J Haematol* **106**(1), 2-8.
- Pfaff, M., Liu, S., Erle, D.J. & Ginsberg, M.H.** (1998) Integrin beta cytoplasmic domains differentially bind to cytoskeletal proteins. *J Biol Chem* **273**(11), 6104-9.
- Phee, H., Jacob, A. & Coggeshall, K.M.** (2000) Enzymatic activity of the Src homology 2 domain-containing inositol phosphatase is regulated by a plasma membrane location. *J Biol Chem* **275**(25), 19090-7.
- Platanias, L.C., Pfeffer, L.M., Barton, K.P., Vardiman, J.W., Golomb, H.M. & Colamonici, O.R.** (1992) Expression of the IFN alpha receptor in hairy cell leukaemia. *Br J Haematol* **82**(3), 541-6.
- Platko, J.V., Leonard, D.A., Adra, C.N., Shaw, R.J., Cerione, R.A. & Lim, B.** (1995) A single residue can modify target-binding affinity and activity of the functional domain of the Rho-subfamily GDP dissociation inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(7), 2974-8.
- Pleiman, C.M., Hertz, W.M. & Cambier, J.C.** (1994) Activation of phosphatidylinositol-3' kinase by Src-family kinase SH3 binding to the p85 subunit. *Science* **263**(5153), 1609-12.
- Pollard, T.D., Blanchoin, L. & Mullins, R.D.** (2000) Molecular mechanisms controlling actin filament dynamics in nonmuscle cells. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **29**, 545-76.
- Popoff, M.R., Chaves-Olarte, E., Lemichez, E., von Eichel-Streiber, C., Thelestam, M., Chardin, P., Cussac, D., Antonny, B., Chavrier, P., Flatau, G., Giry, M., de Gunzburg, J. & Boquet, P.** (1996) Ras, Rap, and Rac small GTP-binding proteins are targets for *Clostridium sordellii* lethal toxin glucosylation. *J Biol Chem* **271**(17), 10217-24.
- Prakash, B., Praefcke, G.J., Renault, L., Wittinghofer, A. & Herrmann, C.** (2000a) Structure of human guanylate-binding protein 1 representing a unique class of GTP-binding proteins. *Nature* **403**(6769), 567-71.
- Prakash, B., Renault, L., Praefcke, G.J., Herrmann, C. & Wittinghofer, A.** (2000b) Triphosphate structure of guanylate-binding protein 1 and implications for nucleotide binding and GTPase mechanism. *Embo J* **19**(17), 4555-64.

- Prasad, N., Topping, R.S. & Decker, S.J.** (2001) SH2-containing inositol 5'-phosphatase SHIP2 associates with the p130(Cas) adapter protein and regulates cellular adhesion and spreading. *Mol Cell Biol* **21**(4), 1416-28.
- Prasad, N.K. & Decker, S.J.** (2005) SH2-containing 5'-inositol phosphatase, SHIP2, regulates cytoskeleton organization and ligand-dependent down-regulation of the epidermal growth factor receptor. *J Biol Chem* **280**(13), 13129-36.
- Prendergast, G.C.** (2001) Actin' up: RhoB in cancer and apoptosis. *Nat Rev Cancer* **1**(2), 162-8.
- Prieto-Sanchez, R.M. & Bustelo, X.R.** (2003) Structural basis for the signaling specificity of RhoG and Rac1 GTPases. *J Biol Chem* **278**(39), 37916-25.
- Prisco, A., Vanes, L., Ruf, S., Trigueros, C. & Tybulewicz, V.L.** (2005) Lineage-specific requirement for the PH domain of Vav1 in the activation of CD4+ but not CD8+ T cells. *Immunity* **23**(3), 263-74.
- Pulle, G., Vidric, M. & Watts, T.H.** (2006) IL-15-dependent induction of 4-1BB promotes antigen-independent CD8 memory T cell survival. *J Immunol* **176**(5), 2739-48.
- Pullen, N., Dennis, P.B., Andjelkovic, M., Dufner, A., Kozma, S.C., Hemmings, B.A. & Thomas, G.** (1998) Phosphorylation and activation of p70s6k by PDK1. *Science* **279**(5351), 707-10.
- Qiu, R.G., Chen, J., Kirn, D., McCormick, F. & Symons, M.** (1995) An essential role for Rac in Ras transformation. *Nature* **374**(6521), 457-9.
- Quesada, J.R., Reuben, J., Manning, J.T., Hersh, E.M. & Gutterman, J.U.** (1984) Alpha interferon for induction of remission in hairy-cell leukemia. *N Engl J Med* **310**(1), 15-8.
- Raftopoulou, M., Etienne-Manneville, S., Self, A., Nicholls, S. & Hall, A.** (2004) Regulation of cell migration by the C2 domain of the tumor suppressor PTEN. *Science* **303**(5661), 1179-81.
- Rameh, L.E., Arvidsson, A., Carraway, K.L., 3rd, Couvillon, A.D., Rathbun, G., Crompton, A., VanRenterghem, B., Czech, M.P., Ravichandran, K.S., Burakoff, S.J., Wang, D.S., Chen, C.S. & Cantley, L.C.** (1997a) A comparative analysis of the phosphoinositide binding specificity of pleckstrin homology domains. *J Biol Chem* **272**(35), 22059-66.
- Rameh, L.E. & Cantley, L.C.** (1999) The role of phosphoinositide 3-kinase lipid products in cell function. *J Biol Chem* **274**(13), 8347-50.
- Rameh, L.E., Chen, C.S. & Cantley, L.C.** (1995) Phosphatidylinositol (3,4,5)P3 interacts with SH2 domains and modulates PI 3-kinase association with tyrosine-phosphorylated proteins. *Cell* **83**(5), 821-30.
- Rameh, L.E., Rhee, S.G., Spokes, K., Kazlauskas, A., Cantley, L.C. & Cantley, L.G.** (1998) Phosphoinositide 3-kinase regulates phospholipase Cgamma-mediated calcium signaling. *J Biol Chem* **273**(37), 23750-7.
- Rameh, L.E., Tolias, K.F., Duckworth, B.C. & Cantley, L.C.** (1997b) A new pathway for synthesis of phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate. *Nature* **390**(6656), 192-6.
- Ramos, S., Khademi, F., Somesh, B.P. & Rivero, F.** (2002) Genomic organization and expression profile of the small GTPases of the RhoBTB family in human and mouse. *Gene* **298**(2), 147-57.
- Rane, M.J., Coxon, P.Y., Powell, D.W., Webster, R., Klein, J.B., Pierce, W., Ping, P. & McLeish, K.R.** (2001) p38 Kinase-dependent MAPKAPK-2 activation functions as 3-phosphoinositide-dependent kinase-2 for Akt in human neutrophils. *J Biol Chem* **276**(5), 3517-23.
- Rane, M.J., Pan, Y., Singh, S., Powell, D.W., Wu, R., Cummins, T., Chen, Q., McLeish, K.R. & Klein, J.B.** (2003) Heat shock protein 27 controls apoptosis by regulating Akt activation. *J Biol Chem* **278**(30), 27828-35.
- Ranson, T., Vosshenrich, C.A., Corcuff, E., Richard, O., Muller, W. & Di Santo, J.P.** (2003) IL-15 is an essential mediator of peripheral NK-cell homeostasis. *Blood* **101**(12), 4887-93.
- Ravichandran, L.V., Chen, H., Li, Y. & Quon, M.J.** (2001) Phosphorylation of PTP1B at Ser(50) by Akt impairs its ability to dephosphorylate the insulin receptor. *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)* **15**(10), 1768-1780.
- Re, F., Zanetti, A., Sironi, M., Polentarutti, N., Lanfrancone, L., Dejana, E. & Colotta, F.** (1994) Inhibition of anchorage-dependent cell spreading triggers apoptosis in cultured human endothelial cells. *J Cell Biol* **127**(2), 537-46.
- Reif, K., Nobes, C.D., Thomas, G., Hall, A. & Cantrell, D.A.** (1996) Phosphatidylinositol 3-kinase signals activate a selective subset of Rac/Rho-dependent effector pathways. *Curr Biol* **6**(11), 1445-55.
- Reiske, H.R., Kao, S.C., Cary, L.A., Guan, J.L., Lai, J.F. & Chen, H.C.** (1999) Requirement of phosphatidylinositol 3-kinase in focal adhesion kinase-promoted cell migration. *J Biol Chem* **274**(18), 12361-6.
- Remy, I. & Michnick, S.W.** (2004) Regulation of apoptosis by the Ft1 protein, a new modulator of protein kinase B/Akt. *Mol Cell Biol* **24**(4), 1493-504.
- Ren, S.Y., Xue, F., Feng, J. & Skorski, T.** (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.
- Rena, G., Guo, S., Cichy, S.C., Unterman, T.G. & Cohen, P.** (1999) Phosphorylation of the transcription factor forkhead family member FKHR by protein

- kinase B. *The Journal Of Biological Chemistry* **274**(24), 17179-17183.
- Resat, H., Straatsma, T.P., Dixon, D.A. & Miller, J.H.** (2001) The arginine finger of RasGAP helps Gln-61 align the nucleophilic water in GAP-stimulated hydrolysis of GTP. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(11), 6033-8.
- Reuveni, H., Livnah, N., Geiger, T., Klein, S., Ohne, O., Cohen, I., Benhar, M., Gellerman, G. & Levitzki, A.** (2002) Toward a PKB inhibitor: modification of a selective PKA inhibitor by rational design. *Biochemistry* **41**(32), 10304-14.
- Revenu, C., Athman, R., Robine, S. & Louvard, D.** (2004) The co-workers of actin filaments: from cell structures to signals. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**(8), 635-46.
- Rezniczek, G.A., de Pereda, J.M., Reipert, S. & Wiche, G.** (1998) Linking integrin alpha6beta4-based cell adhesion to the intermediate filament cytoskeleton: direct interaction between the beta4 subunit and plectin at multiple molecular sites. *J Cell Biol* **141**(1), 209-25.
- Rhee, S.G. & Bae, Y.S.** (1997) Regulation of phosphoinositide-specific phospholipase C isozymes. *J Biol Chem* **272**(24), 15045-8.
- Richards, S.A., Fu, J., Romanelli, A., Shimamura, A. & Blenis, J.** (1999) Ribosomal S6 kinase 1 (RSK1) activation requires signals dependent on and independent of the MAP kinase ERK. *Curr Biol* **9**(15), 810-20.
- Ridley, A.J. & Hall, A.** (1992a) Distinct patterns of actin organization regulated by the small GTP-binding proteins Rac and Rho. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **57**, 661-71.
- Ridley, A.J. & Hall, A.** (1992b) 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., Paterson, H.F., Johnston, C.L., Diekmann, D. & Hall, A.** (1992) The small GTP-binding protein rac regulates growth factor-induced membrane ruffling. *Cell* **70**(3), 401-10.
- Ridley, A.J., Schwartz, M.A., Burridge, K., Firtel, R.A., Ginsberg, M.H., Borisy, G., Parsons, J.T. & Horwitz, A.R.** (2003) Cell migration: integrating signals from front to back. *Science* **302**(5651), 1704-9.
- Ridley, A.J., Self, A.J., Kasmi, F., Paterson, H.F., Hall, A., Marshall, C.J. & Ellis, C.** (1993) rho family GTPase activating proteins p190, bcr and rhoGAP show distinct specificities in vitro and in vivo. *Embo J* **12**(13), 5151-60.
- Riemenschneider, M.J., Betensky, R.A., Pasedag, S.M. & Louis, D.N.** (2006) AKT activation in human glioblastomas enhances proliferation via TSC2 and S6 kinase signaling. *Cancer Res* **66**(11), 5618-23.
- Riento, K. & Ridley, A.J.** (2003) Rocks: multifunctional kinases in cell behaviour. *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**(6), 446-56.
- Riento, K., Villalonga, P., Garg, R. & Ridley, A.** (2005) Function and regulation of RhoE. *Biochem Soc Trans* **33**(Pt 4), 649-51.
- Ringwald, M., Schuh, R., Vestweber, D., Eistetter, H., Lottspeich, F., Engel, J., Dolz, R., Jahnig, F., Epplen, J., Mayer, S. & et al.** (1987) The structure of cell adhesion molecule uvomorulin. Insights into the molecular mechanism of Ca²⁺-dependent cell adhesion. *Embo J* **6**(12), 3647-53.
- Riscoe, M.K., Brouns, M.C. & Fitchen, J.H.** (1989) Purine metabolism as a target for leukemia chemotherapy. *Blood Rev* **3**(3), 162-73.
- Rizo, J. & Sudhof, T.C.** (1998) C2-domains, structure and function of a universal Ca²⁺-binding domain. *J Biol Chem* **273**(26), 15879-82.
- Rohatgi, R., Ma, L., Miki, H., Lopez, M., Kirchhausen, T., Takenawa, T. & Kirschner, M.W.** (1999) The interaction between N-WASP and the Arp2/3 complex links Cdc42-dependent signals to actin assembly. *Cell* **97**(2), 221-31.
- Roovers, K. & Assoian, R.K.** (2003) Effects of rho kinase and actin stress fibers on sustained extracellular signal-regulated kinase activity and activation of G(1) phase cyclin-dependent kinases. *Mol Cell Biol* **23**(12), 4283-94.
- Roovers, K., Klein, E.A., Castagnino, P. & Assoian, R.K.** (2003) Nuclear translocation of LIM kinase mediates Rho-Rho kinase regulation of cyclin D1 expression. *Dev Cell* **5**(2), 273-84.
- Rosenblatt, J., Cramer, L.P., Baum, B. & McGee, K.M.** (2004) Myosin II-dependent cortical movement is required for centrosome separation and positioning during mitotic spindle assembly. *Cell* **117**(3), 361-72.
- Rossig, L., Jadidi, A.S., Urbich, C., Badorff, C., Zeiher, A.M. & Dimmeler, S.** (2001) Akt-dependent phosphorylation of p21(Cip1) regulates PCNA binding and proliferation of endothelial cells. *Molecular And Cellular Biology* **21**(16), 5644-5657.
- Rossmann, K.L. & Campbell, S.L.** (2000) Bacterial expressed DH and DH/PH domains. *Methods Enzymol* **325**, 25-38.
- Rossmann, K.L., Worthylake, D.K., Snyder, J.T., Siderovski, D.P., Campbell, S.L. & Sodek, J.** (2002) A crystallographic view of interactions between Dbs and Cdc42: PH domain-assisted guanine nucleotide exchange. *Embo J* **21**(6), 1315-26.
- Roy, H.K., Olusola, B.F., Clemens, D.L., Karolski, W.J., Ratashak, A., Lynch, H.T. & Smyrk, T.C.** (2002) AKT proto-oncogene overexpression is an early event during sporadic colon carcinogenesis. *Carcinogenesis* **23**(1), 201-5.
- Rul, W., Zugasti, O., Roux, P., Peyssonnaud, C., Eychene, A., Franke, T.F., Lenormand, P., Fort, P.**

- &Hibner, U.** (2002) Activation of ERK, controlled by Rac1 and Cdc42 via Akt, is required for anoikis. *Ann N Y Acad Sci* **973**, 145-8.
- Ruoslahti, E. & Reed, J.C.** (1994) Anchorage dependence, integrins, and apoptosis. *Cell* **77**(4), 477-8.
- Russo, C., Gao, Y., Mancini, P., Vanni, C., Porotto, M., Falasca, M., Torrissi, M.R., Zheng, Y. & Eva, A.** (2001) Modulation of oncogenic DBL activity by phosphoinositol phosphate binding to pleckstrin homology domain. *J Biol Chem* **276**(22), 19524-31.
- Sabharanjak, S., Sharma, P., Parton, R.G. & Mayor, S.** (2002) GPI-anchored proteins are delivered to recycling endosomes via a distinct cdc42-regulated, clathrin-independent pinocytotic pathway. *Dev Cell* **2**(4), 411-23.
- Sable, C.L., Filippa, N., Hemmings, B. & Van Obberghen, E.** (1997) cAMP stimulates protein kinase B in a Wortmannin-insensitive manner. *FEBS Lett* **409**(2), 253-7.
- Sahai, E. & Marshall, C.J.** (2003) Differing modes of tumour cell invasion have distinct requirements for Rho/ROCK signalling and extracellular proteolysis. *Nat Cell Biol* **5**(8), 711-9.
- Sahai, E., Olson, M.F. & Marshall, C.J.** (2001) Cross-talk between Ras and Rho signalling pathways in transformation favours proliferation and increased motility. *Embo J* **20**(4), 755-66.
- Saito, K., Tolias, K.F., Saci, A., Koon, H.B., Humphries, L.A., Scharenberg, A., Rawlings, D.J., Kinet, J.P. & Carpenter, C.L.** (2003) BTK regulates PtdIns-4,5-P2 synthesis: importance for calcium signaling and PI3K activity. *Immunity* **19**(5), 669-78.
- Sakai, T., Li, S., Docheva, D., Grashoff, C., Sakai, K., Kostka, G., Braun, A., Pfeifer, A., Yurchenco, P.D. & Fassler, R.** (2003) Integrin-linked kinase (ILK) is required for polarizing the epiblast, cell adhesion, and controlling actin accumulation. *Genes Dev* **17**(7), 926-40.
- Salim, K., Bottomley, M.J., Querfurth, E., Zvelebil, M.J., Gout, I., Scaife, R., Margolis, R.L., Gigg, R., Smith, C.I., Driscoll, P.C., Waterfield, M.D. & Panayotou, G.** (1996) Distinct specificity in the recognition of phosphoinositides by the pleckstrin homology domains of dynamin and Bruton's tyrosine kinase. *Embo J* **15**(22), 6241-50.
- Saltel, F., Destaing, O., Bard, F., Eichert, D. & Jurdic, P.** (2004) Apatite-mediated actin dynamics in resorbing osteoclasts. *Mol Biol Cell* **15**(12), 5231-41.
- Sambani, C., Trafalis, D.T., Mitsoulis-Mentzikoff, C., Poulakidas, E., Makropoulos, V., Pantelias, G.E. & Mecucci, C.** (2001) Clonal chromosome rearrangements in hairy cell leukemia: personal experience and review of literature. *Cancer Genet Cytogenet* **129**(2), 138-44.
- Samuels, Y. & Ericson, K.** (2006) Oncogenic PI3K and its role in cancer. *Curr Opin Oncol* **18**(1), 77-82.
- Samuels, Y. & Velculescu, V.E.** (2004) Oncogenic mutations of PIK3CA in human cancers. *Cell Cycle* **3**(10), 1221-4.
- Sander, E.E., ten Klooster, J.P., van Delft, S., van der Kammen, R.A. & Collard, J.G.** (1999) Rac downregulates Rho activity: reciprocal balance between both GTPases determines cellular morphology and migratory behavior. *J Cell Biol* **147**(5), 1009-22.
- Sanders, L.C., Matsumura, F., Bokoch, G.M. & de Lanerolle, P.** (1999) Inhibition of myosin light chain kinase by p21-activated kinase. *Science* **283**(5410), 2083-5.
- Sano, H., Kane, S., Sano, E., Miinea, C.P., Asara, J.M., Lane, W.S., Garner, C.W. & Lienhard, G.E.** (2003) Insulin-stimulated phosphorylation of a Rab GTPase-activating protein regulates GLUT4 translocation. *J Biol Chem* **278**(17), 14599-602.
- Santagata, S., Boggon, T.J., Baird, C.L., Gomez, C.A., Zhao, J., Shan, W.S., Myszkowski, D.G. & Shapiro, L.** (2001) G-protein signaling through tubby proteins. *Science* **292**(5524), 2041-50.
- Santos, M., Paramio, J.M., Bravo, A., Ramirez, A. & Jorcano, J.L.** (2002) The expression of keratin k10 in the basal layer of the epidermis inhibits cell proliferation and prevents skin tumorigenesis. *J Biol Chem* **277**(21), 19122-30.
- Sarbassov, D.D., Ali, S.M., Kim, D.H., Guertin, D.A., Latek, R.R., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P. & Sabatini, D.M.** (2004) Rictor, a novel binding partner of mTOR, defines a rapamycin-insensitive and raptor-independent pathway that regulates the cytoskeleton. *Curr Biol* **14**(14), 1296-302.
- Sarbassov, D.D., Guertin, D.A., Ali, S.M. & Sabatini, D.M.** (2005) Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science* **307**(5712), 1098-101.
- Sato, S., Fujita, N. & Tsuruo, T.** (2000) Modulation of Akt kinase activity by binding to Hsp90. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(20), 10832-7.
- Saven, A., Burian, C., Koziol, J.A. & Piro, L.D.** (1998) Long-term follow-up of patients with hairy cell leukemia after cladribine treatment. *Blood* **92**(6), 1918-26.
- Sawada, Y. & Sheetz, M.P.** (2002) Force transduction by Triton cytoskeletons. *J Cell Biol* **156**(4), 609-15.
- Sbrissa, D., Ikonov, O.C., Strakova, J. & Shisheva, A.** (2004) Role for a novel signaling intermediate, phosphatidylinositol 5-phosphate, in insulin-regulated F-actin stress fiber breakdown and GLUT4 translocation. *Endocrinology* **145**(11), 4853-65.
- Schafer, D.A., Jennings, P.B. & Cooper, J.A.** (1996) Dynamics of capping protein and actin assembly in

- vitro: uncapping barbed ends by polyphosphoinositides. *J Cell Biol* **135**(1), 169-79.
- Schaller, M.D., Hildebrand, J.D., Shannon, J.D., Fox, J.W., Vines, R.R. & Parsons, J.T.** (1994) Autophosphorylation of the focal adhesion kinase, pp125FAK, directs SH2-dependent binding of pp60src. *Mol Cell Biol* **14**(3), 1680-8.
- Scheffzek, K., Ahmadian, M.R., Kabsch, W., Wiesmuller, L., Lautwein, A., Schmitz, F. & Wittinghofer, A.** (1997) The Ras-RasGAP complex: structural basis for GTPase activation and its loss in oncogenic Ras mutants. *Science* **277**(5324), 333-8.
- Scheid, M.P., Huber, M., Damen, J.E., Hughes, M., Kang, V., Neilsen, P., Prestwich, G.D., Krystal, G. & Duronio, V.** (2002a) Phosphatidylinositol (3,4,5)P3 is essential but not sufficient for protein kinase B (PKB) activation; phosphatidylinositol (3,4)P2 is required for PKB phosphorylation at Ser-473: studies using cells from SH2-containing inositol-5-phosphatase knockout mice. *J Biol Chem* **277**(11), 9027-35.
- Scheid, M.P., Marignani, P.A. & Woodgett, J.R.** (2002b) Multiple phosphoinositide 3-kinase-dependent steps in activation of protein kinase B. *Mol Cell Biol* **22**(17), 6247-60.
- Scherle, P., Behrens, T. & Staudt, L.M.** (1993) Lymphoid GDI, a GDP-dissociation inhibitor of the RhoA GTP-binding protein, is expressed preferentially in lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**(16), 7568-72.
- Schlaepfer, D.D. & Hunter, T.** (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.
- Schleiffenbaum, B. & Fehr, J.** (1990) The tumor necrosis factor receptor and human neutrophil function. Deactivation and cross-deactivation of tumor necrosis factor-induced neutrophil responses by receptor down-regulation. *J Clin Invest* **86**(1), 184-95.
- Schmelzle, T. & Hall, M.N.** (2000) TOR, a central controller of cell growth. *Cell* **103**(2), 253-62.
- Schmidt, A. & Hall, A.** (2002) Guanine nucleotide exchange factors for Rho GTPases: turning on the switch. *Genes Dev* **16**(13), 1587-609.
- Schmidt, G., Sehr, P., Wilm, M., Selzer, J., Mann, M. & Aktories, K.** (1997) Gln 63 of Rho is deamidated by Escherichia coli cytotoxic necrotizing factor-1. *Nature* **387**(6634), 725-9.
- Schrek, R. & Donnelly, W.J.** (1966) "Hairy" cells in blood in lymphoreticular neoplastic disease and "flagellated" cells of normal lymph nodes. *Blood* **27**(2), 199-211.
- Schultz, J., Ponting, C.P., Hofmann, K. & Bork, P.** (1997) SAM as a protein interaction domain involved in developmental regulation. *Protein Sci* **6**(1), 249-53.
- Schuringa, J.J., Dekker, L.V., Vellenga, E. & Kruijer, W.** (2001) Sequential activation of Rac-1, SEK-1/MKK-4, and protein kinase Cdelta is required for interleukin-6-induced STAT3 Ser-727 phosphorylation and transactivation. *J Biol Chem* **276**(29), 27709-15.
- Schurmann, A., Mooney, A.F., Sanders, L.C., Sells, M.A., Wang, H.G., Reed, J.C. & Bokoch, G.M.** (2000) p21-activated kinase 1 phosphorylates the death agonist bad and protects cells from apoptosis. *Mol Cell Biol* **20**(2), 453-61.
- Schwartz, M.** (2004) Rho signalling at a glance. *J Cell Sci* **117**(Pt 23), 5457-8.
- Schwartz, M.A. & Shattil, S.J.** (2000) Signaling networks linking integrins and rho family GTPases. *Trends Biochem Sci* **25**(8), 388-91.
- Schwartzberg, P.L.** (2003) Amplifying Btk's signal. *Immunity* **19**(5), 634-6.
- Scott, P.H., Brunn, G.J., Kohn, A.D., Roth, R.A. & Lawrence, J.C., Jr.** (1998) Evidence of insulin-stimulated phosphorylation and activation of the mammalian target of rapamycin mediated by a protein kinase B signaling pathway. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America* **95**(13), 7772-7777.
- Seals, D.F., Azucena, E.F., Jr., Pass, I., Tesfay, L., Gordon, R., Woodrow, M., Resau, J.H. & Courtneidge, S.A.** (2005) The adaptor protein Tks5/Fish is required for podosome formation and function, and for the protease-driven invasion of cancer cells. *Cancer Cell* **7**(2), 155-65.
- Seipel, K., O'Brien, S.P., Iannotti, E., Medley, Q.G. & Streuli, M.** (2001) Tara, a novel F-actin binding protein, associates with the Trio guanine nucleotide exchange factor and regulates actin cytoskeletal organization. *J Cell Sci* **114**(Pt 2), 389-99.
- Seki, T., Yun, J. & Oh, S.P.** (2003) Arterial endothelium-specific activin receptor-like kinase 1 expression suggests its role in arterialization and vascular remodeling. *Circ Res* **93**(7), 682-9.
- Sekimata, M., Kabuyama, Y., Emori, Y. & Homma, Y.** (1999) Morphological changes and detachment of adherent cells induced by p122, a GTPase-activating protein for Rho. *J Biol Chem* **274**(25), 17757-62.
- Servant, G., Weiner, O.D., Herzmark, P., Balla, T., Sedat, J.W. & Bourne, H.R.** (2000) Polarization of chemoattractant receptor signaling during neutrophil chemotaxis. *Science* **287**(5455), 1037-40.
- Shao, X., Li, C., Fernandez, I., Zhang, X., Sudhof, T.C. & Rizo, J.** (1997) Synaptotagmin-syntaxin interaction: the C2 domain as a Ca²⁺-dependent electrostatic switch. *Neuron* **18**(1), 133-42.
- Sharma, C.P., Ezzell, R.M. & Arnaout, M.A.** (1995) Direct interaction of filamin (ABP-280) with the beta 2-integrin subunit CD18. *J Immunol* **154**(7), 3461-70.

- Shattil, S.J., O'Toole, T., Eigenthaler, M., Thon, V., Williams, M., Babior, B.M. & Ginsberg, M.H.** (1995) Beta 3-endonexin, a novel polypeptide that interacts specifically with the cytoplasmic tail of the integrin beta 3 subunit. *J Cell Biol* **131**(3), 807-16.
- Shaw, M., Cohen, P. & Alessi, D.R.** (1998) The activation of protein kinase B by H₂O₂ or heat shock is mediated by phosphoinositide 3-kinase and not by mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase-2. *Biochem J* **336** (Pt 1), 241-6.
- Shayesteh, L., Lu, Y., Kuo, W.L., Baldocchi, R., Godfrey, T., Collins, C., Pinkel, D., Powell, B., Mills, G.B. & Gray, J.W.** (1999) PIK3CA is implicated as an oncogene in ovarian cancer. *Nat Genet* **21**(1), 99-102.
- Shen, Y. & Schaller, M.D.** (1999) Focal adhesion targeting: the critical determinant of FAK regulation and substrate phosphorylation. *Mol Biol Cell* **10**(8), 2507-18.
- Shimaoka, M., Takagi, J. & Springer, T.A.** (2002) Conformational regulation of integrin structure and function. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **31**, 485-516.
- Shimizu, H. & Hupp, T.R.** (2003) Intracellular regulation of MDM2. *Trends in Biochemical Sciences* **28**(7), 346-349.
- Shin, I., Yakes, F.M., Rojo, F., Shin, N.Y., Bakin, A.V., Baselga, J. & Arteaga, C.L.** (2002) PKB/Akt mediates cell-cycle progression by phosphorylation of p27(Kip1) at threonine 157 and modulation of its cellular localization. *Nat Med* **8**(10), 1145-52.
- Sho, E., Sho, M., Singh, T.M., Nanjo, H., Komatsu, M., Xu, C., Masuda, H. & Zarins, C.K.** (2002) Arterial enlargement in response to high flow requires early expression of matrix metalloproteinases to degrade extracellular matrix. *Exp Mol Pathol* **73**(2), 142-53.
- Simpson, L. & Parsons, R.** (2001) PTEN: life as a tumor suppressor. *Exp Cell Res* **264**(1), 29-41.
- Singh, A., Karnoub, A.E., Palmby, T.R., Lengyel, E., Sondek, J. & Der, C.J.** (2004) Rac1b, a tumor associated, constitutively active Rac1 splice variant, promotes cellular transformation. *Oncogene* **23**(58), 9369-80.
- Skolnik, E.Y., Margolis, B., Mohammadi, M., Lowenstein, E., Fischer, R., Drepps, A., Ullrich, A. & Schlessinger, J.** (1991) Cloning of PI3 kinase-associated p85 utilizing a novel method for expression/cloning of target proteins for receptor tyrosine kinases. *Cell* **65**(1), 83-90.
- Skowronek, K.R., Guo, F., Zheng, Y. & Nassar, N.** (2004) The C-terminal basic tail of RhoG assists the guanine nucleotide exchange factor trio in binding to phospholipids. *J Biol Chem* **279**(36), 37895-907.
- Sly, L.M., Rauh, M.J., Kalesnikoff, J., Song, C.H. & Krystal, G.** (2004) LPS-induced upregulation of SHIP is essential for endotoxin tolerance. *Immunity* **21**(2), 227-39.
- Snoek, G.T.** (2004) Phosphatidylinositol transfer proteins: emerging roles in cell proliferation, cell death and survival. *IUBMB Life* **56**(8), 467-75.
- Snyder, J.T., Singer, A.U., Wing, M.R., Harden, T.K. & Sondek, J.** (2003) The pleckstrin homology domain of phospholipase C-beta2 as an effector site for Rac. *J Biol Chem* **278**(23), 21099-104.
- Soga, N., Connolly, J.O., Chellaiah, M., Kawamura, J. & Hruska, K.A.** (2001a) Rac regulates vascular endothelial growth factor stimulated motility. *Cell Commun Adhes* **8**(1), 1-13.
- Soga, N., Namba, N., McAllister, S., Cornelius, L., Teitelbaum, S.L., Dowdy, S.F., Kawamura, J. & Hruska, K.A.** (2001b) Rho family GTPases regulate VEGF-stimulated endothelial cell motility. *Exp Cell Res* **269**(1), 73-87.
- Song, J., Salek-Ardakani, S., Rogers, P.R., Cheng, M., Van Parijs, L. & Croft, M.** (2004) The costimulation-regulated duration of PKB activation controls T cell longevity. *Nat Immunol* **5**(2), 150-8.
- Song, X., Xu, W., Zhang, A., Huang, G., Liang, X., Virbasius, J.V., Czech, M.P. & Zhou, G.W.** (2001) Phox homology domains specifically bind phosphatidylinositol phosphates. *Biochemistry* **40**(30), 8940-4.
- Spinardi, L., Rietdorf, J., Nitsch, L., Bono, M., Tacchetti, C., Way, M. & Marchisio, P.C.** (2004) A dynamic podosome-like structure of epithelial cells. *Exp Cell Res* **295**(2), 360-74.
- Spoerner, M., Herrmann, C., Vetter, I.R., Kalbitzer, H.R. & Wittinghofer, A.** (2001) Dynamic properties of the Ras switch I region and its importance for binding to effectors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(9), 4944-9.
- Sprang, S.R.** (1997) G protein mechanisms: insights from structural analysis. *Annu Rev Biochem* **66**, 639-78.
- Springer, T.A.** (1990) Leucocyte adhesion to cells. *Scand J Immunol* **32**(3), 211-6.
- Springer, T.A.** (1994) Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell* **76**(2), 301-14.
- Springer, T.A.** (1997) Folding of the N-terminal, ligand-binding region of integrin alpha-subunits into a beta-propeller domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(1), 65-72.
- Srinivasan, S., Wang, F., Glavas, S., Ott, A., Hofmann, F., Aktories, K., Kalman, D. & Bourne, H.R.** (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.
- 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**(14), 5034-7.
- Staal, S.P., Hartley, J.W. & Rowe, W.P.** (1977) Isolation of transforming murine leukemia viruses from mice with a high incidence of spontaneous lymphoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**(7), 3065-7.
- Staal, S.P., Huebner, K., Croce, C.M., Parsa, N.Z. & Testa, J.R.** (1988) The AKT1 proto-oncogene maps to human chromosome 14, band q32. *Genomics* **2**(1), 96-8.
- Stal, O., Perez-Tenorio, G., Akerberg, L., Olsson, B., Nordenskjold, B., Skoog, L. & Rutqvist, L.E.** (2003) Akt kinases in breast cancer and the results of adjuvant therapy. *Breast Cancer Res* **5**(2), R37-44.
- Stam, J.C., Sander, E.E., Michiels, F., van Leeuwen, F.N., Kain, H.E., van der Kammen, R.A. & Collard, J.G.** (1997) Targeting of Tiam1 to the plasma membrane requires the cooperative function of the N-terminal pleckstrin homology domain and an adjacent protein interaction domain. *J Biol Chem* **272**(45), 28447-54.
- Stambolic, V., Suzuki, A., de la Pompa, J.L., Brothers, G.M., Mirtsos, C., Sasaki, T., Ruland, J., Penninger, J.M., Siderovski, D.P. & Mak, T.W.** (1998) Negative regulation of PKB/Akt-dependent cell survival by the tumor suppressor PTEN. *Cell* **95**(1), 29-39.
- Steck, P.A., Pershouse, M.A., Jasser, S.A., Yung, W.K., Lin, H., Ligon, A.H., Langford, L.A., Baumgard, M.L., Hattier, T., Davis, T., Frye, C., Hu, R., Swedlund, B., Teng, D.H. & Tavtigian, S.V.** (1997) Identification of a candidate tumour suppressor gene, MMAC1, at chromosome 10q23.3 that is mutated in multiple advanced cancers. *Nat Genet* **15**(4), 356-62.
- Stein, R.C. & Waterfield, M.D.** (2000) PI3-kinase inhibition: a target for drug development? *Mol Med Today* **6**(9), 347-57.
- Stephens, L., Anderson, K., Stokoe, D., Erdjument-Bromage, H., Painter, G.F., Holmes, A.B., Gaffney, P.R., Reese, C.B., McCormick, F., Tempst, P., Coadwell, J. & Hawkins, P.T.** (1998) Protein kinase B kinases that mediate phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate-dependent activation of protein kinase B. *Science* **279**(5351), 710-4.
- Stephens, L.R., Hughes, K.T. & Irvine, R.F.** (1991) Pathway of phosphatidylinositol(3,4,5)-trisphosphate synthesis in activated neutrophils. *Nature* **351**(6321), 33-9.
- Stokoe, D., Stephens, L.R., Copeland, T., Gaffney, P.R., Reese, C.B., Painter, G.F., Holmes, A.B., McCormick, F. & Hawkins, P.T.** (1997) Dual role of phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate in the activation of protein kinase B. *Science* **277**(5325), 567-70.
- Subauste, M.C., Von Herrath, M., Benard, V., Chamberlain, C.E., Chuang, T.H., Chu, K., Bokoch, G.M. & Hahn, K.M.** (2000) Rho family proteins modulate rapid apoptosis induced by cytotoxic T lymphocytes and Fas. *J Biol Chem* **275**(13), 9725-33.
- Suetsugu, S., Kurisu, S., Oikawa, T., Yamazaki, D., Oda, A. & Takenawa, T.** (2006) Optimization of WAVE2 complex-induced actin polymerization by membrane-bound IRSp53, PIP3, and Rac. *J Cell Biol* **173**(4), 571-85.
- Sulciner, D.J., Irani, K., Yu, Z.X., Ferrans, V.J., Goldschmidt-Clermont, P. & Finkel, T.** (1996) rac1 regulates a cytokine-stimulated, redox-dependent pathway necessary for NF-kappaB activation. *Mol Cell Biol* **16**(12), 7115-21.
- Sun, H., Lesche, R., Li, D.M., Liliental, J., Zhang, H., Gao, J., Gavrilova, N., Mueller, B., Liu, X. & Wu, H.** (1999) PTEN modulates cell cycle progression and cell survival by regulating phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate and Akt/protein kinase B signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(11), 6199-204.
- Sun, M., Wang, G., Paciga, J.E., Feldman, R.I., Yuan, Z.Q., Ma, X.L., Shelley, S.A., Jove, R., Tschlis, P.N., Nicosia, S.V. & Cheng, J.Q.** (2001) AKT1/PKBalpha kinase is frequently elevated in human cancers and its constitutive activation is required for oncogenic transformation in NIH3T3 cells. *Am J Pathol* **159**(2), 431-7.
- Suzuki, A., Kusakai, G., Kishimoto, A., Lu, J., Ogura, T. & Esumi, H.** (2003a) ARK5 suppresses the cell death induced by nutrient starvation and death receptors via inhibition of caspase 8 activation, but not by chemotherapeutic agents or UV irradiation. *Oncogene* **22**(40), 6177-82.
- Suzuki, A., Kusakai, G., Kishimoto, A., Lu, J., Ogura, T., Lavin, M.F. & Esumi, H.** (2003b) Identification of a novel protein kinase mediating Akt survival signaling to the ATM protein. *J Biol Chem* **278**(1), 48-53.
- Suzuki, A., Kusakai, G., Kishimoto, A., Shimojo, Y., Miyamoto, S., Ogura, T., Ochiai, A. & Esumi, H.** (2004) Regulation of caspase-6 and FLIP by the AMPK family member ARK5. *Oncogene* **23**(42), 7067-75.
- Suzuki, A. & Ohno, S.** (2006) The PAR-aPKC system: lessons in polarity. *J Cell Sci* **119**(Pt 6), 979-87.
- Suzuki, T., Shoji, S., Yamamoto, K., Nada, S., Okada, M., Yamamoto, T. & Honda, Z.** (1998) Essential roles of Lyn in fibronectin-mediated filamentous actin assembly and cell motility in mast cells. *J Immunol* **161**(7), 3694-701.
- Tahiliani, P.D., Singh, L., Auer, K.L. & LaFlamme, S.E.** (1997) The role of conserved amino acid motifs within the integrin beta3 cytoplasmic domain in triggering focal adhesion kinase phosphorylation. *J Biol Chem* **272**(12), 7892-8.

- Takagi, J. & Springer, T.A.** (2002) Integrin activation and structural rearrangement. *Immunol Rev* **186**, 141-63.
- Takahashi, K., Sasaki, T., Mammoto, A., Takaishi, K., Kameyama, T., Tsukita, S. & Takai, Y.** (1997) Direct interaction of the Rho GDP dissociation inhibitor with ezrin/radixin/moesin initiates the activation of the Rho small G protein. *J Biol Chem* **272**(37), 23371-5.
- Takenawa, T. & Itoh, T.** (2001) Phosphoinositides, key molecules for regulation of actin cytoskeletal organization and membrane traffic from the plasma membrane. *Biochim Biophys Acta* **1533**(3), 190-206.
- Takenawa, T. & Miki, H.** (2001) WASP and WAVE family proteins: key molecules for rapid rearrangement of cortical actin filaments and cell movement. *J Cell Sci* **114**(Pt 10), 1801-9.
- Takeshita, S., Namba, N., Zhao, J.J., Jiang, Y., Genant, H.K., Silva, M.J., Brodt, M.D., Helgason, C.D., Kalesnikoff, J., Rauh, M.J., Humphries, R.K., Krystal, G., Teitelbaum, S.L. & Ross, F.P.** (2002) SHIP-deficient mice are severely osteoporotic due to increased numbers of hyper-resorptive osteoclasts. *Nat Med* **8**(9), 943-9.
- Tamir, I., Stolpa, J.C., Helgason, C.D., Nakamura, K., Bruhns, P., Deroon, M. & Cambier, J.C.** (2000) The RasGAP-binding protein p62dok is a mediator of inhibitory FcγRIIB signals in B cells. *Immunity* **12**(3), 347-58.
- Tamura, M., Gu, J., Matsumoto, K., Aota, S., Parsons, R. & Yamada, K.M.** (1998) Inhibition of cell migration, spreading, and focal adhesions by tumor suppressor PTEN. *Science* **280**(5369), 1614-7.
- Tanabe, K., Tachibana, T., Yamashita, T., Che, Y.H., Yoneda, Y., Ochi, T., Tohyama, M., Yoshikawa, H. & Kiyama, H.** (2000) The small GTP-binding protein TC10 promotes nerve elongation in neuronal cells, and its expression is induced during nerve regeneration in rats. *J Neurosci* **20**(11), 4138-44.
- Tanaka, M., Konishi, H., Touhara, K., Sakane, F., Hirata, M., Ono, Y. & Kikkawa, U.** (1999) Identification of myosin II as a binding protein to the PH domain of protein kinase B. *Biochem Biophys Res Commun* **255**(1), 169-74.
- Tang, Y., Zhou, H., Chen, A., Pittman, R.N. & Field, J.** (2000) The Akt proto-oncogene links Ras to Pak and cell survival signals. *J Biol Chem* **275**(13), 9106-9.
- Tao, W., Pennica, D., Xu, L., Kalejta, R.F. & Levine, A.J.** (2001) Wrch-1, a novel member of the Rho gene family that is regulated by Wnt-1. *Genes Dev* **15**(14), 1796-807.
- Tapon, N., Nagata, K., Lamarche, N. & Hall, A.** (1998) A new rac target POSH is an SH3-containing scaffold protein involved in the JNK and NF-κB signalling pathways. *Embo J* **17**(5), 1395-404.
- Tarone, G., Cirillo, D., Giancotti, F.G., Comoglio, P.M. & Marchisio, P.C.** (1985) Rous sarcoma virus-transformed fibroblasts adhere primarily at discrete protrusions of the ventral membrane called podosomes. *Exp Cell Res* **159**(1), 141-57.
- Tatin, F., Varon, C., Genot, E. & Moreau, V.** (2006) A signalling cascade involving PKC, Src and Cdc42 regulates podosome assembly in cultured endothelial cells in response to phorbol ester. *J Cell Sci* **119**(Pt 4), 769-81.
- Taylor, J.M., Macklem, M.M. & Parsons, J.T.** (1999) Cytoskeletal changes induced by GRAF, the GTPase regulator associated with focal adhesion kinase, are mediated by Rho. *J Cell Sci* **112** (Pt 2), 231-42.
- Taylor, V., Wong, M., Brandts, C., Reilly, L., Dean, N.M., Cowser, L.M., Moodie, S. & Stokoe, D.** (2000) 5' phospholipid phosphatase SHIP-2 causes protein kinase B inactivation and cell cycle arrest in glioblastoma cells. *Mol Cell Biol* **20**(18), 6860-71.
- ten Klooster, J.P., Jaffer, Z.M., Chernoff, J. & Hordijk, P.L.** (2006) Targeting and activation of Rac1 are mediated by the exchange factor beta-Pix. *J Cell Biol* **172**(5), 759-69.
- Teramoto, H., Coso, O.A., Miyata, H., Igishi, T., Miki, T. & Gutkind, J.S.** (1996) Signaling from the small GTP-binding proteins Rac1 and Cdc42 to the c-Jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinase pathway. A role for mixed lineage kinase 3/protein-tyrosine kinase 1, a novel member of the mixed lineage kinase family. *J Biol Chem* **271**(44), 27225-8.
- Teramoto, H., Malek, R.L., Behbahani, B., Castellone, M.D., Lee, N.H. & Gutkind, J.S.** (2003) Identification of H-Ras, RhoA, Rac1 and Cdc42 responsive genes. *Oncogene* **22**(17), 2689-97.
- Thomas, C.C., Deak, M., Alessi, D.R. & van Aalten, D.M.** (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.** (1998) The synthesis and cellular roles of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *Curr Opin Cell Biol* **10**(2), 254-61.
- Toker, A. & Newton, A.C.** (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., Cantley, L.C. & Carpenter, C.L.** (1995) Rho family GTPases bind to phosphoinositide kinases. *J Biol Chem* **270**(30), 17656-9.
- Tolias, K.F., Hartwig, J.H., Ishihara, H., Shibasaki, Y., Cantley, L.C. & Carpenter, C.L.** (2000) Type Iα phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase mediates Rac-dependent actin assembly. *Curr Biol* **10**(3), 153-6.
- Torres, J. & Pulido, R.** (2001) The tumor suppressor PTEN is phosphorylated by the protein kinase CK2 at

- its C terminus. Implications for PTEN stability to proteasome-mediated degradation. *J Biol Chem* **276**(2), 993-8.
- Trencia, A., Perfetti, A., Cassese, A., Vigliotta, G., Miele, C., Oriente, F., Santopietro, S., Giacco, F., Condorelli, G. & Formisano et, a.** (2003) Protein kinase B/Akt binds and phosphorylates PED/PEA-15, stabilizing its antiapoptotic action. *Molecular And Cellular Biology* **23**(13), 4511-4521.
- Troussard, A.A., Mawji, N.M., Ong, C., Mui, A., St-Arnaud, R. & Dedhar, S.** (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.
- Troussard, A.A., McDonald, P.C., Wederell, E.D., Mawji, N.M., Filipenko, N.R., Gelmon, K.A., Kucab, J.E., Dunn, S.E., Emerman, J.T., Bally, M.B. & Dedhar, S.** (2006) Preferential dependence of breast cancer cells versus normal cells on integrin-linked kinase for protein kinase B/Akt activation and cell survival. *Cancer Res* **66**(1), 393-403.
- Troussard, X., Maloisel, F. & Flandrin, G.** (1998) Hairy cell leukemia. What is new forty years after the first description? *Hematol Cell Ther* **40**(4), 139-48.
- Tu, Z., Ninos, J.M., Ma, Z., Wang, J.W., Lemos, M.P., Despons, C., Ghansah, T., Howson, J.M. & Kerr, W.G.** (2001) Embryonic and hematopoietic stem cells express a novel SH2-containing inositol 5'-phosphatase isoform that partners with the Grb2 adapter protein. *Blood* **98**(7), 2028-38.
- Turkson, J., Bowman, T., Adnane, J., Zhang, Y., Djeu, J.Y., Sekharam, M., Frank, D.A., Holzman, L.B., Wu, J., Sebti, S. & Jove, R.** (1999) Requirement for Ras/Rac1-mediated p38 and c-Jun N-terminal kinase signaling in Stat3 transcriptional activity induced by the Src oncoprotein. *Mol Cell Biol* **19**(11), 7519-28.
- Turner, C.E., Brown, M.C., Perrotta, J.A., Riedy, M.C., Nikolopoulos, S.N., McDonald, A.R., Bagrodia, S., Thomas, S. & Leventhal, P.S.** (1999) Paxillin LD4 motif binds PAK and PIX through a novel 95-kD ankyrin repeat, ARF-GAP protein: A role in cytoskeletal remodeling. *J Cell Biol* **145**(4), 851-63.
- Tyers, M., Rachubinski, R.A., Stewart, M.I., Varrichio, A.M., Shorr, R.G., Haslam, R.J. & Harley, C.B.** (1988) Molecular cloning and expression of the major protein kinase C substrate of platelets. *Nature* **333**(6172), 470-3.
- Ueki, K., Fruman, D.A., Yballe, C.M., Fasshauer, M., Klein, J., Asano, T., Cantley, L.C. & Kahn, C.R.** (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.
- Ueki, K., Yballe, C.M., Brachmann, S.M., Vicent, D., Watt, J.M., Kahn, C.R. & Cantley, L.C.** (2002) Increased insulin sensitivity in mice lacking p85beta subunit of phosphoinositide 3-kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(1), 419-24.
- Ugi, S., Imamura, T., Maegawa, H., Egawa, K., Yoshizaki, T., Shi, K., Obata, T., Ebina, Y., Kashiwagi, A. & Olefsky, J.M.** (2004) Protein phosphatase 2A negatively regulates insulin's metabolic signaling pathway by inhibiting Akt (protein kinase B) activity in 3T3-L1 adipocytes. *Mol Cell Biol* **24**(19), 8778-89.
- Valencia, A., Chardin, P., Wittinghofer, A. & Sander, C.** (1991) The ras protein family: evolutionary tree and role of conserved amino acids. *Biochemistry* **30**(19), 4637-48.
- Valiente, M., Andres-Pons, A., Gomar, B., Torres, J., Gil, A., Tapparel, C., Antonarakis, S.E. & Pulido, R.** (2005) Binding of PTEN to specific PDZ domains contributes to PTEN protein stability and phosphorylation by microtubule-associated serine/threonine kinases. *J Biol Chem* **280**(32), 28936-43.
- van de Stolpe, A. & van der Saag, P.T.** (1996) Intercellular adhesion molecule-1. *J Mol Med* **74**(1), 13-33.
- Van Hennik, P.B. & Hordijk, P.L.** (2005) Rho GTPases in hematopoietic cells. *Antioxid Redox Signal* **7**(11-12), 1440-55.
- Van Norman, A.S., Nagorney, D.M., Martin, J.K., Phyllyk, R.L. & Ilstrup, D.M.** (1986) Splenectomy for hairy cell leukemia. A clinical review of 63 patients. *Cancer* **57**(3), 644-8.
- van Weeren, P.C., de Bruyn, K.M., de Vries-Smits, A.M., van Lint, J. & Burgering, B.M.** (1998) Essential role for protein kinase B (PKB) in insulin-induced glycogen synthase kinase 3 inactivation. Characterization of dominant-negative mutant of PKB. *J Biol Chem* **273**(21), 13150-6.
- van Weering, D.H., de Rooij, J., Marte, B., Downward, J., Bos, J.L. & Burgering, B.M.** (1998) Protein kinase B activation and lamellipodium formation are independent phosphoinositide 3-kinase-mediated events differentially regulated by endogenous Ras. *Mol Cell Biol* **18**(4), 1802-11.
- Vanhaesebroeck, B., Ali, K., Bilancio, A., Geering, B. & Foukas, L.C.** (2005) Signalling by PI3K isoforms: insights from gene-targeted mice. *Trends Biochem Sci* **30**(4), 194-204.
- Vanhaesebroeck, B., Leever, S.J., Ahmadi, K., Timms, J., Katso, R., Driscoll, P.C., Woscholski, R., Parker, P.J. & Waterfield, M.D.** (2001) Synthesis and function of 3-phosphorylated inositol lipids. *Annu Rev Biochem* **70**, 535-602.
- Vanni, C., Parodi, A., Mancini, P., Visco, V., Ottaviano, C., Torrisi, M.R. & Eva, A.** (2004) Phosphorylation-independent membrane relocalization of ezrin following association with Dbl in vivo. *Oncogene* **23**(23), 4098-106.

- Varnai, P. & Balla, T. (2006) Live cell imaging of phosphoinositide dynamics with fluorescent protein domains. *Biochim Biophys Acta*.
- Varon, C., Tatin, F., Moreau, V., Van Obberghen-Schilling, E., Fernandez-Sauze, S., Reuzeau, E., Kramer, I. & Genot, E. (2006) Transforming growth factor beta induces rosettes of podosomes in primary aortic endothelial cells. *Mol Cell Biol* **26**(9), 3582-94.
- Vazquez, F., Grossman, S.R., Takahashi, Y., Rokas, M.V., Nakamura, N. & Sellers, W.R. (2001) Phosphorylation of the PTEN tail acts as an inhibitory switch by preventing its recruitment into a protein complex. *J Biol Chem* **276**(52), 48627-30.
- Vedantham, S., Gamliel, H. & Golomb, H.M. (1992) Mechanism of interferon action in hairy cell leukemia: a model of effective cancer biotherapy. *Cancer Res* **52**(5), 1056-66.
- Vella, A.T., Dow, S., Potter, T.A., Kappler, J. & Marrack, P. (1998) Cytokine-induced survival of activated T cells in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(7), 3810-5.
- Venkateswarlu, K., Oatey, P.B., Tavare, J.M. & Cullen, P.J. (1998) Insulin-dependent translocation of ARNO to the plasma membrane of adipocytes requires phosphatidylinositol 3-kinase. *Curr Biol* **8**(8), 463-6.
- Vidal, A., Millard, S.S., Miller, J.P. & Koff, A. (2002) Rho activity can alter the translation of p27 mRNA and is important for RasV12-induced transformation in a manner dependent on p27 status. *J Biol Chem* **277**(19), 16433-40.
- Viglietto, G., Motti, M.L., Bruni, P., Melillo, R.M., D'Alessio, A., Califano, D., Vinci, F., Chiappetta, G., Tsihchlis, P., Bellacosa, A., Fusco, A. & Santoro, M. (2002) Cytoplasmic relocalization and inhibition of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27(Kip1) by PKB/Akt-mediated phosphorylation in breast cancer. *Nat Med* **8**(10), 1136-44.
- Vignal, E., De Toledo, M., Comunale, F., Ladopoulou, A., Gauthier-Rouviere, C., Blangy, A. & Fort, P. (2000) Characterization of TCL, a new GTPase of the rho family related to TC10 and Cdc42. *J Biol Chem* **275**(46), 36457-64.
- Vitale, M., Di Matola, T., Bifulco, M., Casamassima, A., Fenzi, G. & Rossi, G. (1999) Apoptosis induced by denied adhesion to extracellular matrix (anoikis) in thyroid epithelial cells is p53 dependent but fails to correlate with modulation of p53 expression. *FEBS Lett* **462**(1-2), 57-60.
- Vlahos, C.J., Matter, W.F., Hui, K.Y. & Brown, R.F. (1994) A specific inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase, 2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one (LY294002). *J Biol Chem* **269**(7), 5241-8.
- Volinia, S., Dhand, R., Vanhaesebroeck, B., MacDougall, L.K., Stein, R., Zvelebil, M.J., Domin, J., Panaretou, C. & Waterfield, M.D. (1995) A human phosphatidylinositol 3-kinase complex related to the yeast Vps34p-Vps15p protein sorting system. *Embo J* **14**(14), 3339-48.
- Von Pawel-Rammingen, U., Telepnev, M.V., Schmidt, G., Aktories, K., Wolf-Watz, H. & Rosqvist, R. (2000) GAP activity of the Yersinia YopE cytotoxin specifically targets the Rho pathway: a mechanism for disruption of actin microfilament structure. *Mol Microbiol* **36**(3), 737-48.
- von Willebrand, M., Williams, S., Saxena, M., Gilman, J., Tailor, P., Jascur, T., Amarante-Mendes, G.P., Green, D.R. & Mustelin, T. (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.
- Voncken, J.W., Kaartinen, V., Pattengale, P.K., Germeraad, W.T., Groffen, J. & Heisterkamp, N. (1995) BCR/ABL P210 and P190 cause distinct leukemia in transgenic mice. *Blood* **86**(12), 4603-11.
- Wada, T., Sasaoka, T., Funaki, M., Hori, H., Murakami, S., Ishiki, M., Haruta, T., Asano, T., Ogawa, W., Ishihara, H. & Kobayashi, M. (2001) Overexpression of SH2-containing inositol phosphatase 2 results in negative regulation of insulin-induced metabolic actions in 3T3-L1 adipocytes via its 5'-phosphatase catalytic activity. *Mol Cell Biol* **21**(5), 1633-46.
- Walker, E.H., Perisic, O., Ried, C., Stephens, L. & Williams, R.L. (1999) Structural insights into phosphoinositide 3-kinase catalysis and signalling. *Nature* **402**(6759), 313-20.
- Wang, J.M., Chao, J.R., Chen, W., Kuo, M.L., Yen, J.J. & Yang-Yen, H.F. (1999) The antiapoptotic gene mcl-1 is up-regulated by the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway through a transcription factor complex containing CREB. *Mol Cell Biol* **19**(9), 6195-206.
- Wang, Y., Helland, A., Holm, R., Kristensen, G.B. & Borresen-Dale, A.L. (2005) PIK3CA mutations in advanced ovarian carcinomas. *Hum Mutat* **25**(3), 322.
- Ward, S.G., June, C.H. & Olive, D. (1996) PI 3-kinase: a pivotal pathway in T-cell activation? *Immunol Today* **17**(4), 187-97.
- Ward, S.G., Ley, S.C., MacPhee, C. & Cantrell, D.A. (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**(1), 45-9.
- Wary, K.K., Mariotti, A., Zurzolo, C. & Giancotti, F.G. (1998) A requirement for caveolin-1 and associated kinase Fyn in integrin signaling and anchorage-dependent cell growth. *Cell* **94**(5), 625-34.
- Watton, S.J. & Downward, J. (1999) Akt/PKB localisation and 3' phosphoinositide generation at sites of epithelial cell-matrix and cell-cell interaction. *Curr Biol* **9**(8), 433-6.

- Wei, Y., Zhang, Y., Derewenda, U., Liu, X., Minor, W., Nakamoto, R.K., Somlyo, A.V., Somlyo, A.P. & Derewenda, Z.S. (1997) Crystal structure of RhoA-GDP and its functional implications. *Nat Struct Biol* **4**(9), 699-703.
- Welch, H., Eguinoa, A., Stephens, L.R. & Hawkins, P.T. (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.
- Welsh, C.F., Roovers, K., Villanueva, J., Liu, Y., Schwartz, M.A. & Assoian, R.K. (2001) Timing of cyclin D1 expression within G1 phase is controlled by Rho. *Nat Cell Biol* **3**(11), 950-7.
- Wen, Y., Eng, C.H., Schmoranzer, J., Cabrera-Poch, N., Morris, E.J., Chen, M., Wallar, B.J., Alberts, A.S. & Gundersen, G.G. (2004) EB1 and APC bind to mDia to stabilize microtubules downstream of Rho and promote cell migration. *Nat Cell Biol* **6**(9), 820-30.
- Wennerberg, K. & Der, C.J. (2004) Rho-family GTPases: it's not only Rac and Rho (and I like it). *J Cell Sci* **117**(Pt 8), 1301-12.
- Wennerberg, K., Ellerbroek, S.M., Liu, R.Y., Karnoub, A.E., Burrige, K. & Der, C.J. (2002) RhoG signals in parallel with Rac1 and Cdc42. *J Biol Chem* **277**(49), 47810-7.
- Wennstrom, S., Siegbahn, A., Yokote, K., Arvidsson, A.K., Heldin, C.H., Mori, S. & Claesson-Welsh, L. (1994) Membrane ruffling and chemotaxis transduced by the PDGF beta-receptor require the binding site for phosphatidylinositol 3' kinase. *Oncogene* **9**(2), 651-60.
- Westwick, J.K., Lambert, Q.T., Clark, G.J., Symons, M., Van Aelst, L., Pestell, R.G. & Der, C.J. (1997) Rac regulation of transformation, gene expression, and actin organization by multiple, PAK-independent pathways. *Mol Cell Biol* **17**(3), 1324-35.
- Wherlock, M. & Mellor, H. (2002) The Rho GTPase family: a Racs to Wrchs story. *J Cell Sci* **115**(Pt 2), 239-40.
- Wick, K.L. & Liu, F. (2001) A new molecular target of insulin action: regulating the pivotal PDK1. *Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord* **1**(3), 209-21.
- Wick, M.J., Dong, L.Q., Riojas, R.A., Ramos, F.J. & Liu, F. (2000) Mechanism of phosphorylation of protein kinase B/Akt by a constitutively active 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1. *J Biol Chem* **275**(51), 40400-6.
- Wick, M.J., Ramos, F.J., Chen, H., Quon, M.J., Dong, L.Q. & Liu, F. (2003) Mouse 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 undergoes dimerization and trans-phosphorylation in the activation loop. *J Biol Chem* **278**(44), 42913-9.
- Wick, M.J., Wick, K.R., Chen, H., He, H., Dong, L.Q., Quon, M.J. & Liu, F. (2002) Substitution of the autophosphorylation site Thr516 with a negatively charged residue confers constitutive activity to mouse 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 in cells. *J Biol Chem* **277**(19), 16632-8.
- Williams, C.L. (2003) The polybasic region of Ras and Rho family small GTPases: a regulator of protein interactions and membrane association and a site of nuclear localization signal sequences. *Cell Signal* **15**(12), 1071-80.
- Williams, M.R., Arthur, J.S., Balendran, A., van der Kaay, J., Poli, V., Cohen, P. & Alessi, D.R. (2000) The role of 3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1 in activating AGC kinases defined in embryonic stem cells. *Curr Biol* **10**(8), 439-48.
- Wittenmayer, N., Jandrig, B., Rothkegel, M., Schluter, K., Arnold, W., Haensch, W., Scherneck, S. & Jockusch, B.M. (2004) Tumor suppressor activity of profilin requires a functional actin binding site. *Mol Biol Cell* **15**(4), 1600-8.
- Wolf, I., Lucas, D.M., Algate, P.A. & Rohrschneider, L.R. (2000) Cloning of the genomic locus of mouse SH2 containing inositol 5-phosphatase (SHIP) and a novel 110-kDa splice isoform, SHIPdelta. *Genomics* **69**(1), 104-12.
- Wolfrum, C., Besser, D., Luca, E. & Stoffel, M. (2003) Insulin regulates the activity of forkhead transcription factor Hnf-3beta/Foxa-2 by Akt-mediated phosphorylation and nuclear/cytosolic localization. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America* **100**(20), 11624-11629.
- Worthylake, D.K., Rossman, K.L. & Sondek, J. (2000) Crystal structure of Rac1 in complex with the guanine nucleotide exchange region of Tiam1. *Nature* **408**(6813), 682-8.
- Wu, G., Mambo, E., Guo, Z., Hu, S., Huang, X., Gollin, S.M., Trink, B., Ladenson, P.W., Sidransky, D. & Xing, M. (2005) Uncommon mutation, but common amplifications, of the PIK3CA gene in thyroid tumors. *J Clin Endocrinol Metab* **90**(8), 4688-93.
- Wu, X., Ivanova, G., Merup, M., Jansson, M., Stellan, B., Grander, D., Zabarovsky, E., Gahrton, G. & Einhorn, S. (1999) Molecular analysis of the human chromosome 5q13.3 region in patients with hairy cell leukemia and identification of tumor suppressor gene candidates. *Genomics* **60**(2), 161-71.
- Wyllie, A.H., Kerr, J.F. & Currie, A.R. (1980) Cell death: the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol* **68**, 251-306.
- Xing, Y., Liu, D., Zhang, R., Joachimiak, A., Songyang, Z. & Xu, W. (2004) Structural basis of membrane targeting by the Phox homology domain of cytokine-independent survival kinase (CISK-PX). *J Biol Chem* **279**(29), 30662-9.
- Xiong, J.P., Stehle, T., Diefenbach, B., Zhang, R., Dunker, R., Scott, D.L., Joachimiak, A., Goodman,

- S.L. & Arnaout, M.A.** (2001) Crystal structure of the extracellular segment of integrin alpha Vbeta3. *Science* **294**(5541), 339-345.
- Xiong, J.P., Stehle, T., Goodman, S.L. & Arnaout, M.A.** (2003) New insights into the structural basis of integrin activation. *Blood* **102**(4), 1155-9.
- Xu, C., Lee, S., Shu, C., Masuda, H. & Zarins, C.K.** (2002a) Expression of TGF-beta1 and beta3 but not apoptosis factors relates to flow-induced aortic enlargement. *BMC Cardiovasc Disord* **2**(1), 11.
- Xu, J., Liu, D., Gill, G. & Songyang, Z.** (2001) Regulation of cytokine-independent survival kinase (CISK) by the Phox homology domain and phosphoinositides. *J Cell Biol* **154**(4), 699-705.
- Xu, J., Liu, D. & Songyang, Z.** (2002b) The role of Asp-462 in regulating Akt activity. *J Biol Chem* **277**(38), 35561-6.
- Xu, X., Sakon, M., Nagano, H., Hiraoka, N., Yamamoto, H., Hayashi, N., Dono, K., Nakamori, S., Umeshita, K., Ito, Y., Matsuura, N. & Monden, M.** (2004) Akt2 expression correlates with prognosis of human hepatocellular carcinoma. *Oncol Rep* **11**(1), 25-32.
- Xu, Z. & Greene, L.A.** (2006) Activation of the apoptotic JNK pathway through the Rac1-binding scaffold protein POSH. *Methods Enzymol* **406**, 479-89.
- Yamamoto, A., DeWald, D.B., Boronenkov, I.V., Anderson, R.A., Emr, S.D. & Koshland, D.** (1995) Novel PI(4)P 5-kinase homologue, Fab1p, essential for normal vacuole function and morphology in yeast. *Mol Biol Cell* **6**(5), 525-39.
- Yamamoto, M., Marui, N., Sakai, T., Morii, N., Kozaki, S., Ikai, K., Imamura, S. & Narumiya, S.** (1993) ADP-ribosylation of the rhoA gene product by botulinum C3 exoenzyme causes Swiss 3T3 cells to accumulate in the G1 phase of the cell cycle. *Oncogene* **8**(6), 1449-55.
- Yamashiro, S., Totsukawa, G., Yamakita, Y., Sasaki, Y., Madaule, P., Ishizaki, T., Narumiya, S. & Matsumura, F.** (2003) Citron kinase, a Rho-dependent kinase, induces di-phosphorylation of regulatory light chain of myosin II. *Mol Biol Cell* **14**(5), 1745-56.
- Yamashita, T. & Tohyama, M.** (2003) The p75 receptor acts as a displacement factor that releases Rho from Rho-GDI. *Nat Neurosci* **6**(5), 461-7.
- Yang, F.C., Kapur, R., King, A.J., Tao, W., Kim, C., Borneo, J., Breese, R., Marshall, M., Dinauer, M.C. & Williams, D.A.** (2000) Rac2 stimulates Akt activation affecting BAD/Bcl-XL expression while mediating survival and actin function in primary mast cells. *Immunity* **12**(5), 557-68.
- Yang, J., Cron, P., Good, V.M., Thompson, V., Hemmings, B.A. & Barford, D.** (2002a) Crystal structure of an activated Akt/protein kinase B ternary complex with GSK3-peptide and AMP-PNP. *Nat Struct Biol* **9**(12), 940-4.
- Yang, J., Cron, P., Thompson, V., Good, V.M., Hess, D., Hemmings, B.A. & Barford, D.** (2002b) Molecular mechanism for the regulation of protein kinase B/Akt by hydrophobic motif phosphorylation. *Mol Cell* **9**(6), 1227-40.
- Yang, J.Y. & Widmann, C.** (2001) Antiapoptotic signaling generated by caspase-induced cleavage of RasGAP. *Mol Cell Biol* **21**(16), 5346-58.
- Yang, L., Lin, H.K., Altuwajri, S., Xie, S., Wang, L. & Chang, C.** (2003) APPL suppresses androgen receptor transactivation via potentiating Akt activity. *J Biol Chem* **278**(19), 16820-7.
- Yang, L., Thornton, S. & Grom, A.A.** (2002c) Interleukin-15 inhibits sodium nitroprusside-induced apoptosis of synovial fibroblasts and vascular endothelial cells. *Arthritis And Rheumatism* **46**(11), 3010-3014.
- Yap, A.S., Briehner, W.M. & Gumbiner, B.M.** (1997) Molecular and functional analysis of cadherin-based adherens junctions. *Annu Rev Cell Dev Biol* **13**, 119-46.
- Yasuda, S., Ocegüera-Yanez, F., Kato, T., Okamoto, M., Yonemura, S., Terada, Y., Ishizaki, T. & Narumiya, S.** (2004) Cdc42 and mDia3 regulate microtubule attachment to kinetochores. *Nature* **428**(6984), 767-71.
- Ye, K., Hurt, K.J., Wu, F.Y., Fang, M., Luo, H.R., Hong, J.J., Blackshaw, S., Ferris, C.D. & Snyder, S.H.** (2000) Pike. A nuclear gtpase that enhances PI3kinase activity and is regulated by protein 4.1N. *Cell* **103**(6), 919-30.
- Yonemura, S., Matsui, T., Tsukita, S. & Tsukita, S.** (2002) Rho-dependent and -independent activation mechanisms of ezrin/radixin/moesin proteins: an essential role for polyphosphoinositides in vivo. *J Cell Sci* **115**(Pt 12), 2569-80.
- Yoshizaki, T., Maegawa, H., Egawa, K., Ugi, S., Nishio, Y., Imamura, T., Kobayashi, T., Tamura, S., Olefsky, J.M. & Kashiwagi, A.** (2004) Protein phosphatase-2C alpha as a positive regulator of insulin sensitivity through direct activation of phosphatidylinositol 3-kinase in 3T3-L1 adipocytes. *J Biol Chem* **279**(21), 22715-26.
- Yu, D., Zhang, P. & Zhan, X.** (2005) Cortactin mediated morphogenic cell movements during zebrafish (*Danio rerio*) gastrulation. *Sci China C Life Sci* **48**(6), 601-7.
- Yu, J., Wjasow, C. & Backer, J.M.** (1998a) Regulation of the p85/p110alpha phosphatidylinositol 3'-kinase. Distinct roles for the n-terminal and c-terminal SH2 domains. *J Biol Chem* **273**(46), 30199-203.
- Yu, J., Zhang, Y., McIlroy, J., Rordorf-Nikolic, T., Orr, G.A. & Backer, J.M.** (1998b) Regulation of the p85/p110 phosphatidylinositol 3'-kinase: stabilization

- and inhibition of the p110 α catalytic subunit by the p85 regulatory subunit. *Mol Cell Biol* **18**(3), 1379-87.
- Yue, Y., Lypowy, J., Hedhli, N. & Abdellatif, M.** (2004) Ras GTPase-activating protein binds to Akt and is required for its activation. *J Biol Chem* **279**(13), 12883-9.
- Zaidel-Bar, R., Kam, Z. & Geiger, B.** (2005) Polarized downregulation of the paxillin-p130CAS-Rac1 pathway induced by shear flow. *J Cell Sci* **118**(Pt 17), 3997-4007.
- Zak, I., Lewandowska, E. & Gnyp, W.** (2000) Selectin glycoprotein ligands. *Acta Biochim Pol* **47**(2), 393-412.
- Zalcman, G., Closson, V., Camonis, J., Honore, N., Rousseau-Merck, M.F., Tavitian, A. & Olofsson, B.** (1996) RhoGDI-3 is a new GDP dissociation inhibitor (GDI). Identification of a non-cytosolic GDI protein interacting with the small GTP-binding proteins RhoB and RhoG. *J Biol Chem* **271**(48), 30366-74.
- Zang, Q. & Springer, T.A.** (2001) Amino acid residues in the PSI domain and cysteine-rich repeats of the integrin beta2 subunit that restrain activation of the integrin alpha(X)beta(2). *J Biol Chem* **276**(10), 6922-9.
- Zeigerer, A., McBrayer, M.K. & McGraw, T.E.** (2004) Insulin stimulation of GLUT4 exocytosis, but not its inhibition of endocytosis, is dependent on RabGAP AS160. *Mol Biol Cell* **15**(10), 4406-15.
- Zent, R., Fenczik, C.A., Calderwood, D.A., Liu, S., Dellos, M. & Ginsberg, M.H.** (2000) Class- and splice variant-specific association of CD98 with integrin beta cytoplasmic domains. *J Biol Chem* **275**(7), 5059-64.
- Zervas, C.G., Gregory, S.L. & Brown, N.H.** (2001) Drosophila integrin-linked kinase is required at sites of integrin adhesion to link the cytoskeleton to the plasma membrane. *J Cell Biol* **152**(5), 1007-18.
- Zhan, Y., Virbasius, J.V., Song, X., Pomerleau, D.P. & Zhou, G.W.** (2002) The p40phox and p47phox PX domains of NADPH oxidase target cell membranes via direct and indirect recruitment by phosphoinositides. *J Biol Chem* **277**(6), 4512-8.
- Zhang, B., Gao, Y., Moon, S.Y., Zhang, Y. & Zheng, Y.** (2001) Oligomerization of Rac1 GTPase Mediated by the Carboxyl-terminal Polybasic Domain. *J. Biol. Chem.* **276**(12), 8958-8967.
- Zhang, H. & Gallo, K.A.** (2001) Autoinhibition of mixed lineage kinase 3 through its Src homology 3 domain. *J Biol Chem* **276**(49), 45598-603.
- Zhang, H. & Macara, I.G.** (2006) The polarity protein PAR-3 and TIAM1 cooperate in dendritic spine morphogenesis. *Nat Cell Biol* **8**(3), 227-37.
- Zhang, Q.G., Han, D., Xu, J., Lv, Q., Wang, R., Yin, X.H., Xu, T.L. & Zhang, G.Y.** (2006) Ischemic preconditioning negatively regulates plenty of SH3s-mixed lineage kinase 3-Rac1 complex and c-Jun N-terminal kinase 3 signaling via activation of Akt. *Neuroscience*.
- Zhang, R., Luo, D., Miao, R., Bai, L., Ge, Q., Sessa, W.C. & Min, W.** (2005) Hsp90-Akt phosphorylates ASK1 and inhibits ASK1-mediated apoptosis. *Oncogene* **24**(24), 3954-63.
- Zhang, W., Crocker, E., McLaughlin, S. & Smith, S.O.** (2003) Binding of peptides with basic and aromatic residues to bilayer membranes: phenylalanine in the myristoylated alanine-rich C kinase substrate effector domain penetrates into the hydrophobic core of the bilayer. *J Biol Chem* **278**(24), 21459-66.
- Zhang, X., Chattopadhyay, A., Ji, Q.S., Owen, J.D., Ruest, P.J., Carpenter, G. & Hanks, S.K.** (1999) Focal adhesion kinase promotes phospholipase C-gamma1 activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(16), 9021-6.
- Zhang, X.A. & Hemler, M.E.** (1999) Interaction of the integrin beta1 cytoplasmic domain with ICAP-1 protein. *J Biol Chem* **274**(1), 11-9.
- Zhang, Y., Chen, K., Guo, L. & Wu, C.** (2002) Characterization of PINCH-2, a new focal adhesion protein that regulates the PINCH-1-ILK interaction, cell spreading, and migration. *J Biol Chem* **277**(41), 38328-38.
- Zhao, Z.S., Manser, E., Loo, T.H. & Lim, L.** (2000) Coupling of PAK-interacting exchange factor PIX to GIT1 promotes focal complex disassembly. *Mol Cell Biol* **20**(17), 6354-63.
- Zheng, Y., Bagrodia, S. & Cerione, R.A.** (1994) Activation of phosphoinositide 3-kinase activity by Cdc42Hs binding to p85. *J Biol Chem* **269**(29), 18727-30.
- Zheng, Y., Hart, M.J., Shinjo, K., Evans, T., Bender, A. & Cerione, R.A.** (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.
- Zhou, B.P., Liao, Y., Xia, W., Spohn, B., Lee, M.H. & Hung, M.C.** (2001a) Cytoplasmic localization of p21Cip1/WAF1 by Akt-induced phosphorylation in HER-2/neu-overexpressing cells. *Nature Cell Biology* **3**(3), 245-252.
- Zhou, B.P., Liao, Y., Xia, W., Zou, Y., Spohn, B. & Hung, M.C.** (2001b) HER-2/neu induces p53 ubiquitination via Akt-mediated MDM2 phosphorylation. *Nature Cell Biology* **3**(11), 973-982.
- Zigmond, S.H.** (2004) Formin-induced nucleation of actin filaments. *Curr Opin Cell Biol* **16**(1), 99-105.
- Zini, N., Lisignoli, G., Solimando, L., Bavelloni, A., Valmori, A., Cristino, S., Martelli, A.M., Facchini, A. & Maraldi, N.M.** (2005) Quantitative immunodetection of key elements of polyphosphoinositide signal transduction in

osteoblasts from arthritic patients shows a direct correlation with cell proliferation. *Histochem Cell Biol* **124**(2), 131-7.

Zornig, M., Hueber, A., Baum, W. & Evan, G. (2001) Apoptosis regulators and their role in tumorigenesis. *Biochim Biophys Acta* **1551**(2), F1-37.

Zou, H., Li, Y., Liu, X. & Wang, X. (1999) An APAF-1.cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9. *J Biol Chem* **274**(17), 11549-56.

Zuckerbraun, B.S., Shapiro, R.A., Billiar, T.R. & Tzeng, E. (2003) RhoA influences the nuclear localization of extracellular signal-regulated kinases to modulate p21Waf/Cip1 expression. *Circulation* **108**(7), 876-81.

Zugasti, O., Rul, W., Roux, P., Peyssonnaud, C., Eychene, A., Franke, T.F., Fort, P. & Hibner, U. (2001) Raf-MEK-Erk cascade in anoikis is controlled by Rac1 and Cdc42 via Akt. *Mol Cell Biol* **21**(19), 6706-17.

Zuo, J., Stohlman, S.A. & Bergmann, C.C. (2005) IL-15-independent antiviral function of primary and memory CD8+ T cells. *Virology* **331**(2), 338-48.

Résumé

Les RhoGTPases régulent une multitude de fonctions cellulaires. Les travaux présentés dans cette thèse mettent en évidence les interrelations entre deux phénomènes majeurs contrôlés par cette classe de molécules que sont la régulation de l'organisation du cytosquelette d'actine et la survie cellulaire. L'adhérence à la matrice extracellulaire joue un rôle actif dans la survie cellulaire essentiellement grâce à la kinase Akt qui assure la protection contre l'apoptose. La 1^{ère} partie de ce travail a permis de caractériser une nouvelle voie d'activation d'Akt par la GTPase Rac, sollicitée dans des situations où l'interaction avec la matrice est réduite. Mise en évidence dans des cellules non adhérentes, nos travaux montrent que cette voie est également opérationnelle dans des cellules adhérentes mises en suspension. Ces observations sont supportées par la mise en évidence, *in vitro*, d'un complexe contenant Akt et Rac activées dans les cellules en suspension. Dans la 2^{ème} partie, nous avons exploré le rôle des RhoGTPases dans la morphologie de cellules leucémiques atypiques, qui présentent des prolongements cytoplasmiques caractéristiques, les Tricholeucocytes. Nous démontrons une relation entre cette morphologie et un fort taux d'activation des GTPases Rac et Cdc42. Le traitement de ces cellules à l'IFN α normalise ces activités par un mécanisme faisant intervenir RhoA et p53. Dans la 3^{ème} partie, nous nous sommes intéressés à des structures d'adhérence appelés podosomes dont la formation est dépendante des GTPases Cdc42 et RhoA. Nous avons montré pour la première fois, l'existence de ces structures *in vivo*.

Mots-Clés

Rho GTPases, Survie cellulaire, Akt/PKB, cytosquelette d'actine, Tricholeucocytes, podosomes

Implication des Rho GTPases dans la survie cellulaire et l'adhérence : Caractérisation d'une nouvelle voie d'activation de la kinase Akt par Rac

Les RhoGTPases régulent une multitude de fonctions cellulaires. Les travaux présentés dans cette thèse mettent en évidence les interrelations entre deux phénomènes majeurs contrôlés par cette classe de molécules que sont la régulation de l'organisation du cytosquelette d'actine et la survie cellulaire. L'adhérence à la matrice extracellulaire joue un rôle actif dans la survie cellulaire essentiellement grâce à la kinase Akt qui assure la protection contre l'apoptose. La 1^{ère} partie de ce travail a permis de caractériser une nouvelle voie d'activation d'Akt par la GTPase Rac, sollicitée dans des situations où l'interaction avec la matrice est réduite. Mise en évidence dans des cellules non adhérentes, nos travaux montrent que cette voie est également opérationnelle dans des cellules adhérentes mises en suspension. Ces observations sont supportées par la mise en évidence, *in vitro*, d'un complexe contenant Akt et Rac activées dans les cellules en suspension. Dans la 2^{ème} partie, nous avons exploré le rôle des RhoGTPases dans la morphologie de cellules leucémiques atypiques, qui présentent des prolongements cytoplasmiques caractéristiques, les Tricholeucocytes. Nous démontrons une relation entre cette morphologie et un fort taux d'activation des GTPases Rac et Cdc42. Le traitement de ces cellules à l'IFN γ normalise ces activités par un mécanisme faisant intervenir RhoA et p53. Dans la 3^{ème} partie, nous nous sommes intéressés à des structures d'adhérence appelés podosomes dont la formation est dépendante des GTPases Cdc42 et RhoA. Nous avons montré pour la première fois, l'existence de ces structures *in vivo*.

Implication of Rho GTPases in cellular survival and adherence: Characterization of a new activation pathway of Akt kinase by the GTPase Rac

RhoGTPases control a multitude of cellular functions. The work presented in this thesis highlights the relationships between two major phenomena controlled by this class of molecules which are the regulation of the organization of the actin cytoskeleton and cellular survival. Adhesion to the extracellular matrix plays an essential role in cellular survival thanks to the Akt kinase which ensures protection against the apoptosis. The first part of this work led us to characterize a new pathway of activation of Akt by the GTPase Rac, requested when the interactions with the matrix are reduced. Highlighted in nonadherent cells, our work shows that this way is also operational in adherent cells grown in suspension. These observations are supported by the description, *in vitro*, of a complex containing Akt and Rac activated in the cells in suspension. In the 2nd part, we explored the role of RhoGTPases in the morphology of atypical leukemic cells, the Tricholeucocytes which present characteristic cytoplasmic protrusions. We show a relation between this morphology and a strong rate of activation of GTPases Rac and Cdc42. Treatment of these cells by IFN γ normalize the activities by a mechanism RhoA and p53 dependant. In the 3rd part, we were interested in structures of adherence called podosomes on which formation is dependent on GTPases Cdc42 and RhoA. We showed for the first time, the existence of these structures *in vivo*.

Mots-Clés

Rho GTPases, Survie cellulaire, Akt/PKB, cytosquelette d'actine, Tricholeucocytes, podosomes