

THESE

Présentée à

L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES DE LILLE

Pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LILLE

Option : Sciences de la Vie et de la Santé

Par

Franck VANDERMOERE

PROTEOMIQUE FONCTIONNELLE DE LA SIGNALISATION DE LA KINASE AKT DANS LE CANCER DU SEIN

Soutenue le 30 septembre 2005 devant la commission d'examen :

Président : Dr. Jean-Claude MICHALSKI (Université de Lille)
Rapporteurs : Dr. Marc BRACKE (Université de Gand)
Dr. Serhiy SOUCHELNYTSKYI (Ludwig Institute, Uppsala)
Examineurs : Pr. Jérôme LEMOINE (Université de Lyon)
Co-encadrante : Dr. Ikram EL YAZIDI-BELKOURA (Université de Lille)
Directeur de thèse : Pr. Hubert HONDERMARCK (Université de Lille)

*A ma Pimousse,
à ma famille,
pour leur soutien et leur amour.*

Les travaux de thèse présentés dans ce mémoire ont été réalisés sous le tutorat scientifique de Monsieur le Professeur Hubert Hondermarck, et co-encadrés par Madame le Docteur Ikram El Yazidi- Belkoura, dans l'unité INSERM ERI-8 « Signalisation des facteurs de croissance dans le cancer du sein. Protéomique fonctionnelle », IFR-118 de l'Université des Sciences et Technologies de Lille.

Pendant les trois premières années, un soutien à ces recherches a été apporté par une allocation du ministère de la recherche, puis par une bourse de soudure de 1 an financée par la Ligue Nationale contre le Cancer.

Remerciements

Je tiens à remercier Monsieur le Professeur Hubert Hondemarck, qui dirige l'unité INSERM ERI-8, pour l'accueil au sein de son laboratoire et son encadrement de qualité. « Merci Hubert pour votre punch et nos petites discussions énergiques ».

Je remercie Madame le Docteur Ikram El Yazidi- Belkoura, pour son encadrement de qualité, sa psychologie et son optimisme inaltérable. « Merci Ikram pour votre dynamisme et votre disponibilité de tous les instants».

Je souhaite remercier vivement, pour l'honneur qu'ils me font, Monsieur le Docteur Jean-Claude Michalski, qui a accepté de présider ce jury, Messieurs les Docteurs Marc Bracke et Serhiy Souchelnyski, qui ont accepté d'être rapporteurs de cette thèse et Monsieur le Professeur Jérôme Lemoine, qui a accepté d'examiner ce travail.

Je tiens à remercier Adeline Lepage, Bernadette Codeville, Guy Ricart et Jérôme Lemoine pour l'aide et les conseils prodigués à un « petit biologiste qui s'est lancé en spectrométrie de masse ». Merci aussi à Olivia Dekeyser qui m'a formé à l'électrophorèse bidimensionnelle.

Je tiens à remercier Christian Sliomianny et Etienne pour tous les «bons tuyaux », réactifs (et chocolats) qu'ils m'ont dispensés durant ces années de voisinage.

Je remercie les personnes avec qui j'ai eu la chance de collaborer durant cette thèse : Christian Slomianny, Cécile Cren-Olivé, Marianne Fillet, Stéphanie Thébault, Gabriel Bidaux, Mathieu Flourakis et Caroline Tokarski.

Je remercie l'ensemble des titulaires de l'unité pour leurs remarques constructives lors des « lab meetings ».

Je remercie Johann et zaza pour leur aide technique et leur bonne humeur.

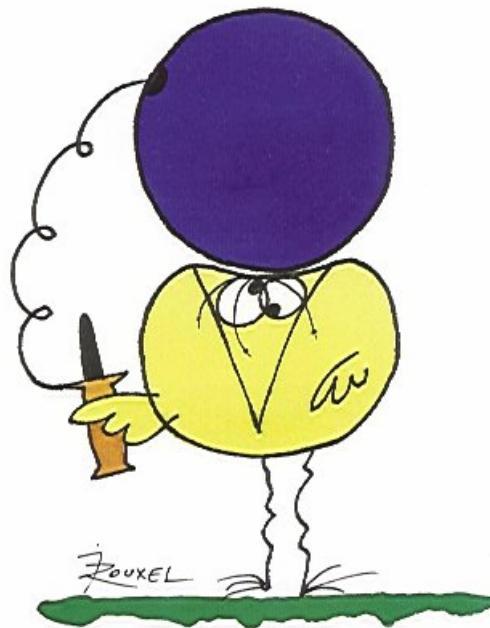
Je tiens à remercier Sylviane Derache, Valérie Burlion et Chantal Bétrancourt pour leur gentillesse malgré toutes les questions administratives que je leur posais.

Je tiens à adresser mes plus vifs remerciements à David Vergote et Laurent Dollé pour leur amitié. « Même si des mers voire des océans vont maintenant nous séparer, je suis vraiment heureux d'avoir des amis tels que vous ».

Une petite pensée pour tous les jeunes qui m'ont cotoyé au sein de l'unité : Yohann, Sylvain, Virginie, Nathalie, Chann, Valérie, Bob, Emmanuelle, Alessandro, Elsa, Sandrine, Tewfik, Frédéric, Chantal, Samuel, Dana, Fabrice, Stéphanie et Rodrigue. « Je vous souhaite toute la réussite que vous méritez ».

Je remercie encore La ligue Nationale contre le Cancer, et le ministère de la recherche pour leurs soutiens financiers au cours de ces années.

Les devises Shadok



EN ESSAYANT CONTINUUELLEMENT
ON FINIT PAR RÉUSSIR. DONC:
PLUS ÇA RATE, PLUS ON A
DE CHANCES QUE ÇA MARCHE.

SOMMAIRE

Sommaire	9
Résumé.....	11
Abbreviations.....	13
Introduction	17
Généralités	19
Chapitre 1 : Cancérogénèse mammaire	21
I. La glande mammaire normale.....	21
A. Anatomie et histologie	21
B. La glande mammaire, un organe en remaniement continuuel.....	23
C. Molécules contrôlant la glande mammaire	24
II. La glande mammaire tumorale	26
A. Epidémiologie	26
B. Les types de cancer du sein.....	26
C. Mécanismes cellulaires et moléculaires de la cancérogénèse mammaire	27
Chapitre 2: le FGF-2, ses récepteurs et sa signalisation jusque la PI3K.....	37
I. Les FGFs.....	37
II. Le FGF-2	37
III. FGF-2, transformation cellulaire et développement tumoral	38
IV. Les récepteurs au FGF	39
V. Activation de la PI3K par le FGFR.....	42
Chapitre 3 : la kinase Akt.....	47
I. Gènes de Akt	47
II. Transcrits de Akt	48
III. Structure de la protéine Akt	48
IV. Expression de Akt	50
V. Activation de Akt	51
VI. Philogénie de la protéine Akt.....	54
VII. Identification des substrats de Akt.....	56
VIII. Effecteurs de Akt	60
A. Contrôle de la survie cellulaire par Akt	60
B. Contrôle du cycle cellulaire par Akt	64
IX. Conséquence de la perturbation de la voie Akt	65
A. Modèles murins pour la voie PI3K/Akt	65
B. Altérations de la voie PI3K/Akt dans les cancers	67
C. Akt et cancer du sein.....	69
X. Ciblage de la voie PI3K/Akt.....	69
Chapitre 4 : la protéomique et l'étude des voies de signalisation	71

I.	Profilage de l'expression des protéines par électrophorèse 2D.....	72
II.	Shotgun.....	73
III.	Marquage isotopique.....	73
IV.	Micropuces.....	74
V.	Etude de la phosphorylation.....	75
VI.	Etude des interactions protéine-protéine.....	76
A.	Criblage double-hybride.....	77
B.	« Blue native – PAGE » (BN-PAGE).....	78
C.	Co-immunoprécipitation.....	79
D.	Retard sur gel.....	80
E.	« Glutathion S transferase – pull down ».....	80
F.	Méthode « phage-display ».....	80
G.	« tandem affinity purification » (TAP).....	81
Chapitre 5 : Spectrométrie de masse pour l'étude des protéines.....		83
I.	Les sources adaptées aux biomolécules.....	83
II.	L'interface.....	87
III.	Les analyseurs.....	87
IV.	Analyse en mode MS-MS.....	90
V.	Identification de protéines par spectrométrie de masse.....	92
Résultats.....		97
Article 1 : The anti-apoptotic effect of fibroblast growth factor-2 is mediated through nuclear factor-kB activation induced via interaction between Akt and IκB kinase-b in breast cancer cells.....		99
Article 2 : The Valosin-Containing Protein (VCP) is a Target of Akt Signaling Required for Cell Survival.....		113
Article 3: Proteomic Exploration Reveals Actin as a major Signaling Partner of the sérine/threonine kinase Akt.....		133
Discussion.....		171
Bibliographie.....		185
Annexes.....		217
Annexe 1 : Proteomics in Oncology:the Breast Cancer Experience.....		219
Annexe 2 : Differential Expression of Proteins in Response to Ceramide-Mediated Stress Signal in Colon Cancer Cells by 2-D Gel Electrophoresis and MALDI-TOF-MS.....		245
Annexe 3 : masses monoisotopiques des 20 acides aminés.....		258
Annexe 4 : table des figures.....		259

RESUME

Une caractéristique essentielle des cellules cancéreuses est leur aptitude à survivre aux environnements hostiles. Sur différentes cellules de cancer du sein, nous avons étudié les effets du fibroblast growth factor-2 (FGF-2) sur l'apoptose induite par le céramide C2 et les drogues chimiothérapeutiques 5-FU, camptothécine et étoposide. Par emploi d'inhibiteurs pharmacologiques, de dominants négatifs et de siRNA, nous avons montré que la voie PI3K/Akt est essentielle à la signalisation antiapoptotique du FGF-2. Nous avons ensuite étudié la signalisation de Akt par protéomique : co-immunoprécipitation, séparation des partenaires en SDS-PAGE ou 2D-E et identification par spectrométrie de masse. Les nouveaux partenaires de signalisation de Akt que nous avons caractérisés sont I κ B kinase β (IKK β), la valosin-containing protein (VCP) et l'actine qui sont phosphorylés par Akt lors d'une stimulation par les facteurs de croissance. La microscopie confocale a permis de confirmer ces interactions. L'identification de l'actine comme substrat de Akt fournit un lien entre action des facteurs de croissance et remaniement du cytosquelette. L'ensemble de ce travail permet de mieux définir la signalisation de la survie des cellules de cancer du sein et de proposer VCP comme cible thérapeutique.

ABBREVIATIONS

2D-E	bidimensionnal electrophoresis
5-FU	5-fluorouracile
ADNc	acide désoxyribonucléique complémentaire
AGC kinase	cAMP-dependent protein kinase A/ protein kinase G/ protein kinase C
AP-1	activator protein-1
Apaf1	apoptotic protease activating factor 1
ARNm	acide ribonucléique messenger
ASK1	apoptosis signal-regulating kinase 1
ATP	adenosine triphosphate
Bcl	B cell lymphoma
BDNF	brain-derived growth factor
BN-PAGE	blue native-PAGE
BRCA	breast cancer
BT-20	breast tumor 20
CREB	(cAMP)-response element binding protein
CRK	chicken related kinase
EGF	epidermal growth factor
eNOS	endothelial nitrogen synthase
ESI	electrospray ionisation
FGF	fibroblast growth factor
FGF-R	FGF-receptor
FKHR	Forkhead
FRS2	FGF-receptor substrate 2
FTICR	Fourier transform ion cyclotron resonance
Gab	Grb2-associated binder
GFRE	growth factor response element
Grb2	growth factor receptor-bound protein 2
GSK3	glycogen synthase kinase 3
GST	glutathion S-transferase
HAT	histone acetyl-transferase
HDAC	histone deacetylase
HGF/SF	hepatocyte growth factor/scatter factor
HSP	heat shock protein
HSPG	heparan sulfate proteoglycane
hTERT	human telomerase retrotranscriptase
IAP	inhibitor of apoptosis protease
ICAT	isotope-coded affinity tag
IGF	insulin-like growth factor
IGFBP	IGF binding protein
IκB	inhibitor kappaB

IKK	inhibitor kappaB kinase
IL	Interleukine
ILK	integrin-linked kinase
IMAC	immobilized metal affinity chromatography
IP	Immunoprecipitation
IR	Infrarouge
IRS	insulin receptor substrate
IT	ionic trap
JNK	c-jun N-terminal kinase
kDa	Kilodalton
KO	knock down
LC	liquid chromatography
LEF1	lymphoid enhancer factor-1
LOH	loss of heterozygosity
MALDI	matrix-assisted laser desorption/ionisation
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MCF-7	Michigan cancer foundation 7
MDGF	mammary derived growth factor
mdm2	murine double minute 2
MLK3	Mixed lineage kinase 3
MMP	matricial metalloprotease
MS	mass spectrometry
MS-MS	spectrométrie de masse en tandem
mTOR	mammalian target of rapamycin
NFκB	nuclear factor kappaB
NGF	nerve growth factor
NLS	nuclear localization sequence
ORF	open reading frame
PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis
PAK	p21-activated kinase
PAS	phospho-Akt substrate
PC12	pheochromocytome 12
PCNA	proliferating cell nuclear antigen
PDE-3B	phosphodiesterase 3B
PDGF	platelet-derived growth factor
PDK	3-phosphoinositide-dependent kinase
PH	pleckstrin homology
PI3K	phosphatidylinositol 3-kinase
PIP	Phosphatidylinositolphosphate
PKA	cAMP-dependent protein kinase
PKB	protein kinase B
PKC	calcium-dependent protein kinase
PLC	phospholipase C
PRK2	protein kinase 2

PRL	prolactine
PTEN	phosphatase and tensin homolog
RAC-PK	related to A and C protein kinase
Rb	retinoblastoma
RE	récepteurs aux oestrogènes
RNAi	RNA interference
RSK	ribosomal S6 kinase
RT-PCR	reverse transcriptase-polymerase chain reaction
SAPK	stress-activated protein kinase
SDS	sodium dodecyl phosphate
SEK1	extracellular signal-regulated kinase
SH	Src homology
Shc	Src homologous and collagen
Shp	structurally related phosphatase
SILAC	stable isotope labeling by aminoacids in cell culture
siRNA	small interfering RNA
sos	son of sevenless
Src	Sarcoma
TAP	tandem affinity purification
TCF	T-cell factor
TGF	transforming growth factor
TNF	tumor necrosis factor
TOF	time-of-flight
TRADD	TNF receptor-associated death domain
TRAIL	TNF-related apoptosis-inducing ligand
TSC	tuberous sclerosis
UTR	untranslated region
UV	ultraviolet
VCP	valosin-containing protein
YAP	yes-associated protein

INTRODUCTION

Akt est une sérine/thréonine kinase suractivée dans de nombreux cancers humains (Sun *et al.* 2001). Le sujet de mon DEA était l'étude de l'effet, sur l'apoptose des cellules de cancer du sein, du fibroblast growth factor-2, facteur de croissance surexprimé dans les tumeurs mammaires (Yiangou *et al.* 1997; Blanckaert *et al.* 1998) et qui stimule leur prolifération et leur migration (Nurcombe *et al.* 2000; Vercoutter-Edouart *et al.* 2000). Une inhibition des voies de signalisation activées classiquement par les récepteurs du FGF-2 a montré que le FGF-2 avait un effet anti-apoptotique sur les cellules de cancer du sein qui nécessitait l'activation de la voie PI3K. Les données de l'époque, montrant l'importance croissante de Akt dans la survie cellulaire, nous ont amené à considérer Akt non plus comme un simple substrat de la signalisation de la PI3K mais comme le principal effecteur dans l'effet de survie des facteurs de croissance. Peu de substrats de Akt étaient alors connus et, sur la base des compétences du laboratoire dans le domaine de la protéomique, nous avons élaboré une approche de protéomique fonctionnelle basée sur la co-immunoprécipitation de Akt et de ses partenaires, leur séparation par SDS-PAGE ou électrophorèse 2D et leur identification par spectrométrie de masse. Afin d'éviter les faux positifs, nous avons réalisé des co-immunoprécipitations reverses pour repérer les protéines aspécifiquement co-immunoprécipitées avec Akt. De même, afin de trouver en priorité des partenaires de Akt impliqués dans la signalisation des facteurs de croissance, nous avons focalisé notre étude sur les protéines dont la co-immunoprécipitation avec Akt est régulée par le FGF-2. Nous avons pu ainsi identifier trois nouveaux substrats de la kinase Akt dont la phosphorylation est induite par les facteurs de croissance. Deux de ces substrats, l'« IκB kinase beta », la « valosin-containing protein », contribuent clairement à la résistance des cellules de cancer du sein aux traitements apoptogènes dont certains sont utilisés en thérapie anti-cancéreuse (Vandermoere *et al.* 2005). Le troisième, l'actine, confirme l'importance maintenant grandissante de Akt dans le contrôle du cytosquelette et les phénomènes qui en découlent. Nous avons également identifié une dizaine de partenaires putatifs de Akt dont l'importance dans la signalisation de la kinase Akt reste à déterminer.

Afin d'introduire les travaux réalisés au cours de ma thèse, je décrirai tout d'abord le cancer du sein et sa régulation par les facteurs de croissance, puis en particulier le fibroblast growth factor-2 et le mode d'activation de la voie PI3K par ce facteur de croissance. Ensuite, je ferai le point sur les données actuelles concernant la signalisation de la kinase Akt et la

recherche de ses substrats. Enfin, je décrirai les différentes approches utilisées dans l'étude des interactions protéine-protéine et, comme les travaux réalisés au cours de ma thèse ont nécessité l'utilisation des techniques de protéomique, je décrirai, d'une part, l'utilisation de la protéomique pour l'étude des voies de signalisation, et d'autre part, les outils de spectrométrie de masse que nous avons utilisés.

GENERALITES

CHAPITRE 1: CANCÉROGÉNÈSE MAMMAIRE

La glande mammaire est un organe finement régulé de part son évolution continue jusqu'à la ménopause. Dans ce chapitre, nous allons décrire la glande mammaire normale et sa régulation par les hormones et les facteurs de croissance, puis nous insisterons sur les dérégulations observées lors du cancer du sein.

I. LA GLANDE MAMMAIRE NORMALE

A. Anatomie et histologie

La glande mammaire est une glande exocrine dont la fonction est la sécrétion lactée. C'est une glande cutanée au même titre que les glandes sudoripares et sébacées. Elle est incluse entièrement dans le pannicule adipeux sous-cutané et rattachée à la peau par ses seuls canaux excréteurs. Elle repose sur le *fascia superficialis* et des tractus fibreux unissant ce dernier à la peau subdivisent le corps adipeux en loges (Figure 1).

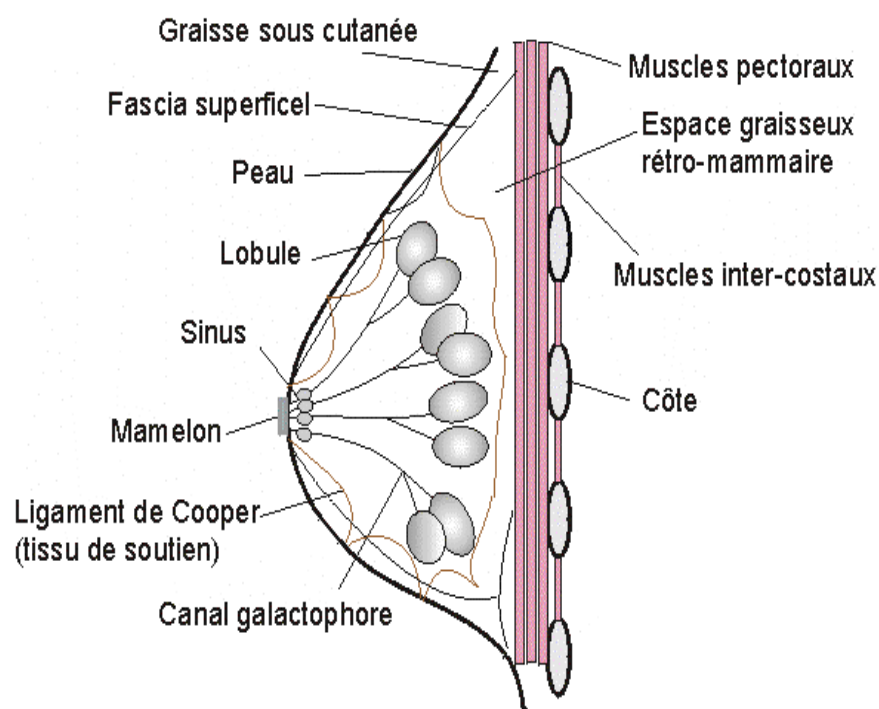


Figure 1. Structure de la glande mammaire (<http://home.tiscali.be/salvatore.murgo/anatomie.htm>)

La glande mammaire est constituée de lobes et de canaux galactophoriques entourés de tissu conjonctif dense dans lequel cheminent des vaisseaux sanguins. Les acini sont groupés de façon très dense autour d'un canalicule intra-lobulaire (ou canal alvéolaire).

Plusieurs canaux alvéolaires se réunissent pour former un canal lobulaire (ou canalicule extra-lobulaire). Cette petite structure forme un lobule. Plusieurs canaux lobulaires se réunissent pour donner un canal galactophore et l'ensemble des lobules qu'il draine forme un lobe glandulaire. La glande mammaire est donc une glande tubulo-acineuse de type composée puisqu'elle est formée de 15 à 20 unités glandulaires indépendantes (lobes) qui sont séparées par du tissu conjonctif dense chaque lobe ayant son propre canal galactophore qui s'ouvre à l'extérieur au niveau du mamelon après s'être élargi en un sinus galactophorique (Figure 2).

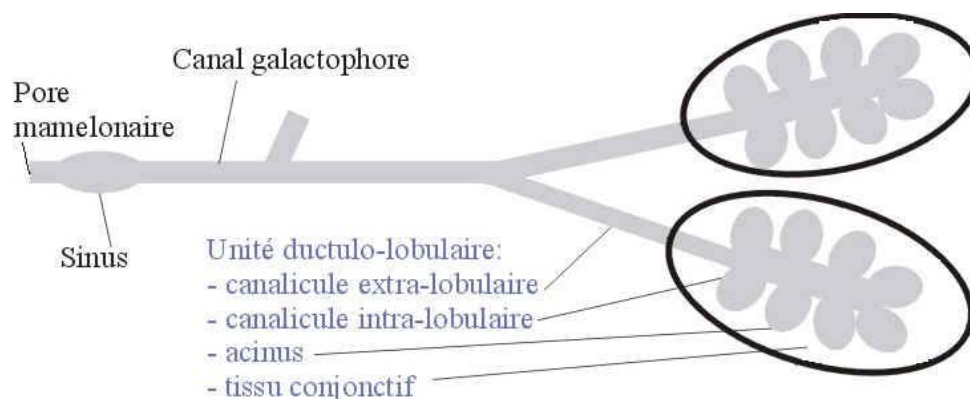


Figure 2. Schéma de l'arbre galactophorique (<http://home.tiscali.be/salvatore.murgo/anatomie.htm>)

Tous les canaux de la glande mammaire sont tapissés d'une couche interne de cellules épithéliales doublée d'une couche perpendiculaire discontinue de cellules myoépithéliales, les deux couches cellulaires reposant sur une lame basale. Autour de cette structure, on trouve un manchon fibroblastique, le tout étant entouré de tissu conjonctif (Figure 3)

Le sein est formé d'au moins quatre principaux types cellulaires. Les cellules épithéliales, de forme cylindrique, forment les alvéoles et les canaux et sécrètent le lait. Ces cellules sont ceinturées par les cellules myoépithéliales, de forme allongée, et qui évacuent le lait en se contractant. Dans le mésenchyme ou stroma, les adipocytes produisent des acides gras polyinsaturés et leurs dérivés, les prostaglandines, qui contribuent à la prolifération et à l'organisation des cellules épithéliales, augmentent la vascularisation de la glande mammaire et favorisent la ramification des canaux mammaires. A proximité des cellules épithéliales, se trouvent les fibroblastes et les myofibroblastes importants pour la formation et la différenciation de l'épithélium mammaire. En effet, ils synthétisent et sécrètent l'HGF (Hepatocyte Growth Factor) qui stimule la migration et la prolifération des cellules

épithéliales, et le collagène I qui participe à la formation de la matrice extracellulaire. Celle-ci exerce des rôles multiples dans l'intégrité de la glande mammaire, et sa dégradation est fortement régulée sous l'action concertée de protéases et d'anti-protéases. L'action de la matrice extra-cellulaire sur les cellules épithéliales est essentielle. Notamment, elle permet à ces cellules de s'organiser en alvéoles, les sensibilise aux hormones lactogènes et inhibe leur croissance. Le tissu mammaire comprend également d'autres types cellulaires moins caractéristiques tels que cellules immunitaires (cellules dendritiques, mastocytes, macrophages) ou cellules des vaisseaux sanguins et lymphatiques (plaquettes, péricytes).

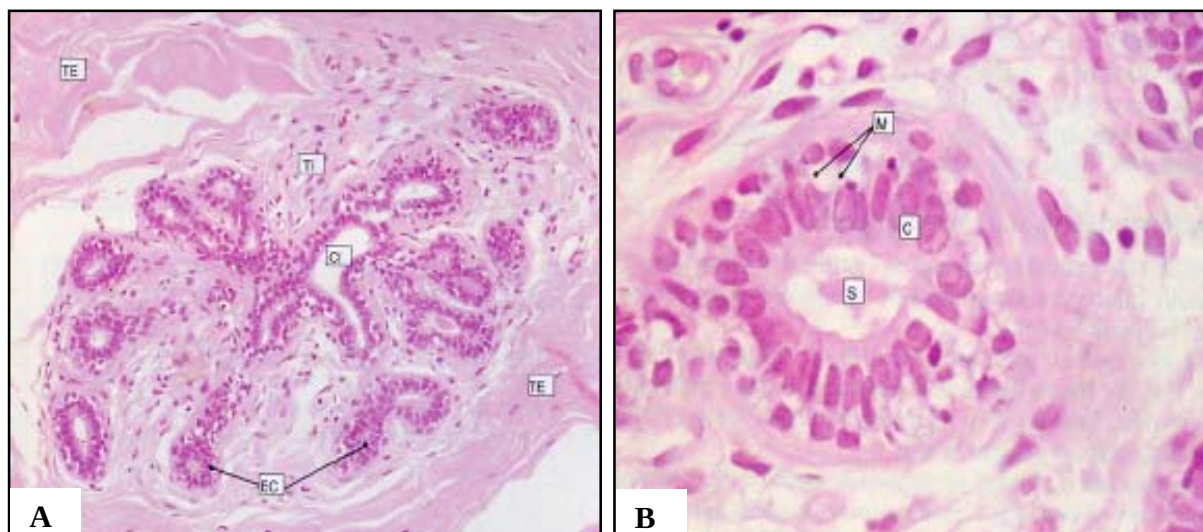


Figure 3. Histologie de la glande mammaire normale. A. Lobule mammaire. B. Canal terminal intralobulaire. La couche interne de l'épithélium a un aspect cubique (C), tandis que la couche externe est constituée de cellules myoépithéliales (M). CI : canal intralobulaire ; EC : extrémités canalaire ; TI : tissu de soutien intralobulaire ; TE : tissu de soutien extralobulaire ; S : sécrétion (d'après Stevens 1992).

B. La glande mammaire, un organe en remaniement continu

Quatre étapes peuvent être décrites dans le développement de la glande mammaire. Elles sont caractérisées par des états particuliers du système lobulo-canalair (Figure 4). Au cours de la vie foetale, le parenchyme (cellules épithéliales et myoépithéliales) et le mésenchyme (fibroblastes et adipocytes) sont mis en place. A la puberté, adipocytes et canaux mammaires se développent sous l'effet d'interactions épithélio-mésenchymateuses. C'est au moment de la gestation et de la lactation que la glande mammaire atteint son développement maximal grâce aux hormones avec une différenciation des acini. Inversement, à chaque fin de cycle menstruel et à la ménopause, la glande mammaire subit une involution caractérisée notamment par une atrophie par apoptose des structures épithéliales.

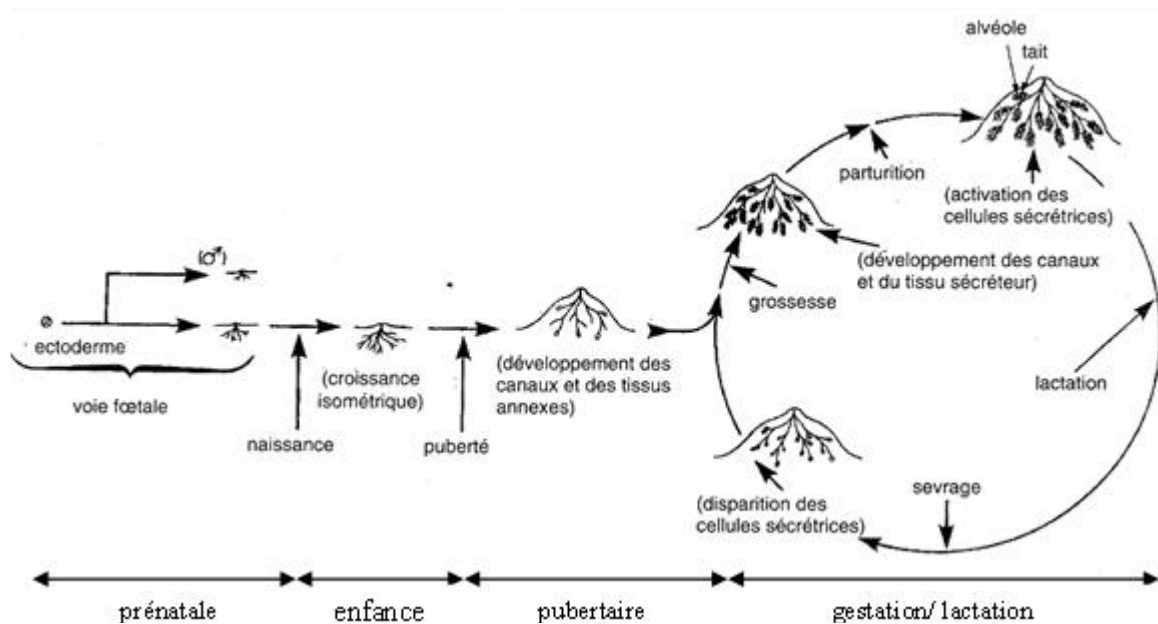


Figure 4. Les différentes phases de la croissance et du fonctionnement de la glande mammaire (d'après Espie *et al.* 1995)

C. Molécules contrôlant la glande mammaire

Le tissu sécréteur mammaire n'a qu'une existence transitoire et cyclique. Ce cycle est finement contrôlé par une balance entre facteurs stimulateurs et inhibiteurs de prolifération et de l'apoptose. Ces facteurs peuvent être des interactions cellules-cellules, cellules-matrice extracellulaire et des messagers diffusibles (hormones, facteurs de croissance). Enfin, la matrice extracellulaire est également essentielle à la croissance, à l'activité et à l'involution de la glande mammaire (Houdebine 1997). C'est le dérèglement de cette homéostasie qui est à l'origine de la cancérogenèse mammaire.

1) Facteurs de croissance

Les facteurs de croissance (Tableau 1) régulent finement l'homéostasie de la glande mammaire normale. Ces facteurs jouant un rôle important au cours de la progression tumorale, nous détaillerons de façon plus poussée leurs effets dans la partie « croissance des cellules tumorales ».

Nom du facteur	Cellule productrice	Effet
Epidermal Growth Factor	cellule épithéliale	stimulateur de la prolifération
Insulin-like Growth Factor-I	cellule (myo) épithéliale	stimulateur de la prolifération
Transforming Growth Factor- α	cellule épithéliale	stimulateur de la prolifération
Fibroblaste Growth Factors	cellule myoépithéliale, épithéliale et fibroblaste	stimulateurs de la prolifération

Mammary Derived Growth Factor-1	cellule épithéliale	stimulateur de la prolifération
Transforming Growth Factor- β	cellule épithéliale	inhibiteur de la prolifération
Insulin-like Growth Factor Binding Proteins	cellule épithéliale	régulateurs négatifs de l'effet de l'IGF-I

Tableau 1. Principaux facteurs de croissance agissant sur les cellules épithéliales mammaires. Les IGFBPs capables de moduler la disponibilité des IGFs ont été classés ici avec les facteurs de croissance.

2) *Hormones*

Les oestrogènes sont impliqués dans la stimulation de la croissance mammaire à la puberté et pendant la grossesse en stimulant la croissance des canaux et en augmentant les récepteurs à la progestérone (Hansen et Bissell 2000). L'oestradiol active la transcription de plusieurs gènes précoces dont *fos*, *jun*, *myc*, *myb* qui, à leur tour, vont permettre de réguler la transcription d'autres gènes. Cette signalisation hormonale passe par les récepteurs aux oestrogènes (RE): le RE α (Greene *et al.* 1986; Greene et Press 1986) et le RE β (Kuiper *et al.* 1996 ; Mosselman *et al.* 1996). Ces récepteurs sont des membres de la superfamille des récepteurs nucléaires et ont des structures fortement homologues mais activent des gènes différents (Thomas *et al.* 2004). Après liaison des oestrogènes, ces récepteurs sont capables de former des homodimères ou des hétérodimères qui activent la transcription de gènes cibles *via* leurs liaisons aux ERE (éléments de réponse aux oestrogènes) (Cowley *et al.* 1997). Bien que la distribution et l'expression *in vivo* de RE α et RE β soient en partie différentes, les deux récepteurs sont colocalisés dans plusieurs tissus comme le sein, l'endomètre, la prostate, les testicules et les ovaires. Le rapport RE α / RE β semble plus élevé dans le tissu tumoral mammaire que dans le tissu normal (Leygue *et al.* 1998). Ces observations suggèrent que l'effet des oestrogènes diffère suivant le ratio de ces deux récepteurs. L'oestradiol régule l'expression de gènes codant pour des facteurs de croissance, comme l'EGF (Dickson *et al.* 1986), le TGF- β (Arrick *et al.* 1990), le TGF- α (Bates *et al.* 1988), l'IGF-II (Osborne *et al.* 1989), le FGF-1 (El Yazidi *et al.* 1998) et ses récepteurs (Dickson *et al.* 2000), de récepteurs des hormones stéroïdes, tel que le RE, ou encore de composants des voies de transduction du signal des facteurs de croissance (*fos*, cycline D1) (May et Westley 1995). Sous l'influence des oestrogènes, les cellules épithéliales synthétisent plus de TGF- α et deviennent plus sensibles à un autre facteur de croissance spécifique de la glande mammaire, le MDGF1 (Mammary Derived Growth Factor 1). Le TGF- α , ainsi que l'EGF et le MDGF-1 induisent la synthèse locale de collagène IV par les cellules épithéliales. Ce type de collagène induit une régulation négative du récepteur du TGF- α . Un des rôles des oestrogènes pourrait donc être

de provoquer une dégradation locale de la matrice extracellulaire qui, elle-même, permettrait aux récepteurs du TGF- α de s'accumuler, sorte de rétrocontrôle négatif. Par conséquent, ces hormones ont un rôle essentiel dans l'homéostasie. En parallèle, les oestrogènes ont une action indirecte sur la prolifération des cellules en stimulant la synthèse de protéases (tels que uPA, Cathepsine D) qui, en dégradant localement la matrice extracellulaire, vont contribuer à la multiplication des cellules (Rochefort 1992 ; Rochefort *et al.* 2001).

A côté des oestrogènes, la prolactine (ou PRL) a également un puissant pouvoir mitogène sur les cellules épithéliales mammaires décuplé par les oestrogènes. On retrouve les récepteurs de la prolactine sur des membranes de cellules de cancer du sein dans environ 40% des cas, sans incidence pronostique (Clevenger 2003). Enfin, l'insuline stimule aussi la prolifération des cellules épithéliales mammaires par l'intermédiaire des récepteurs aux IGFs (Frasca *et al.* 2003).

II. LA GLANDE MAMMAIRE TUMORALE

A. Epidémiologie

Le cancer du sein est le premier cancer féminin avec 42000 nouveaux cas par an en France et le plus létal avec 20% des patientes décédées par cancer. (<http://www.ligue-cancer.asso.fr>). La fréquence du cancer du sein a justifié l'instauration de campagnes de dépistage à grande échelle. Cette pathologie est une maladie d'évolution relativement lente puisqu'on considère qu'il faut 6 à 8 ans pour qu'apparaisse, à partir d'une cellule, une tumeur d'un volume de 2 cm³. C'est pourquoi, le décryptage des mécanismes moléculaires de l'oncogenèse mammaire et son dépistage précoce sont des enjeux de taille.

B. Les types de cancer du sein.

On distingue les tumeurs bénignes, bien limitées et de croissance locale, des tumeurs malignes qui tendent à infiltrer les tissus adjacents. Parmi les tumeurs bénignes existent l'adénofibrome et la tumeur phyllode (3 à 4%). La plupart des tumeurs malignes du sein sont des adénocarcinomes développés soit à partir de l'épithélium des lobules glandulaires (carcinomes lobulaires) soit à partir de l'épithélium des canaux galactophores (carcinomes canaux) et représentent environ 98% des carcinomes mammaires. Dans de rares cas, les cellules cancéreuses mammaires prolifèrent en carcinome *in situ* sans rupture de la lame basale, par opposition au carcinome infiltrant (Saglier & Antoine, 1996). Il existe 4 types

architecturaux de carcinomes canalaire *in situ* (massif, cribriforme, papillaire et comédo). Leur pronostic est excellent. Dans le carcinome lobulaire *in situ*, les canalicules intralobulaires sont comblés et distendus par une prolifération de cellules peu jointives. Il est souvent bilatéral et évolue vers la forme infiltrante dans 20% des cas. Malheureusement, le carcinome est souvent invasif. Les carcinomes les plus fréquents sont les carcinomes canalaire invasifs (85%) et les carcinomes lobulaire invasifs (5%). Il existe aussi des carcinomes infiltrants de formes plus rares, tels que les carcinomes médullaire, les carcinomes mucoïdes (ou colloïdes), carcinomes tubuleux, les carcinomes apocrine et maladie de Paget (tumeur du mamelon). Les tumeurs mammaire liée à des métastases d'autres tissus sont rares, représentent moins de 1% de toutes les tumeurs malignes du sein et constituent un groupe de lésions disparates comportant les sarcomes phyllodes, les sarcomes mésoenchymateux, les angiosarcomes, les lymphomes malins non hodgkiniens primitifs du sein.

Dans notre étude, les modèles cellulaires que nous avons utilisés sont tous épithéliaux comme 98% des cancers du sein. Nous avons, dans une certaine mesure, essayé de rendre compte de l'hétérogénéité des tumeurs mammaire en utilisant 3 types de lignées de cellules épithéliales mammaire (MCF-7, T47-D et BT-20).

C. Mécanismes cellulaires et moléculaire de la cancérogénèse mammaire

1) Une origine multifactorielle.

La cancérogénèse mammaire est un phénomène multifactoriel, impliquant plusieurs gènes, dans les formes héréditaire (anomalies génétiques constitutionnelles) comme dans les formes sporadique (anomalies génétiques somatique). Les modifications les plus fréquemment décrites dans le cancer du sein sont des amplifications d'oncogènes, et des mutations ou délétions de suppresseurs de tumeurs (Thompson et Easton 2004). Comme toute tumeur solide, l'hétérogénéité des cancers du sein implique qu'il existe plusieurs voies menant à la carcinogénèse mammaire avec des étapes différentes. Le cancer solide n'est pas un état statique, mais un processus pathologique évolutif dans lequel les cellules cancéreuses en mutation ne prennent l'ascendant sur les autres que si leur modification leur confère un avantage sélectif (Hanahan et Weinberg 2000). Nous verrons dans le chapitre 3 que la suractivation de Akt est un avantage sélectif non négligeable pour la cellule cancéreuse.

2) ***Les anomalies génétiques.***

a) Amplification et surexpression d'oncogènes

Les altérations génétiques peuvent concerner la partie régulatrice ou la partie codante du gène. Dans les cancers du sein, l'activation des oncogènes par amplification génique a été fréquemment décrite ; les mutations ponctuelles, les insertions ou les réarrangements géniques ont été moins observés (Bieche et Lidereau 1997). Les amplifications les plus fréquentes concernent 3 oncogènes. L'oncogène *myc* est l'un des premiers proto-oncogène étudié. Il est localisé en 8q24, et code pour un facteur de transcription impliqué à la fois dans la croissance, la différenciation et l'apoptose. Sa fréquence d'amplification semble plus fréquente en cas d'atteinte ganglionnaire axillaire, ou de grade histopronostique élevé. Cependant, il semble que des événements additionnels à l'amplification de *myc* soient nécessaires à la tumorigenèse mammaire (Blancato *et al.* 2004).

Un oncogène souvent amplifié dans les tumeurs mammaires est *ccdn1* (11q13). Ce gène code la cycline D1 qui régule le passage G1/S ou G2/M (Bartkova *et al.* 1996). Ce gène est amplifié dans 13 à 20% des carcinomes mammaires (Arnold et Papanikolaou 2005). Comme *myc*, la surexpression de la cycline D1 seule n'a pas un fort pouvoir oncogénique mais est une des premières étapes de l'oncogenèse mammaire (Wang *et al.* 1994).

Enfin, le proto-oncogène c-erbB2 (ou encore HER2) localisé en 17q21-22 est l'homologue humain du gène *neu* isolé de cellules de neuroblastomes induites chez le rat, et représente le troisième oncogène le plus fréquemment amplifié dans les tumeurs mammaires. Il fait partie de la famille des gènes des récepteurs de facteurs de croissance de type I à laquelle appartient le récepteur de l'EGF (Erb-B1). Il est amplifié et ou surexprimé dans 10 à 46% des cas (Jacobs *et al.* 2000). Cette amplification est accompagnée d'une surexpression de l'ARNm et de la protéine (Revillion *et al.* 1998). Les études ont montré que cette amplification était corrélée à des paramètres histologiques ou biologiques d'agressivité, tels qu'un grade histologique élevé, l'absence de récepteurs à l'estradiol. Cette amplification semble plus fréquente dans les cancers canaux (42-45%) par contre elle n'existe pratiquement jamais en cas de forme lobulaire.

Nous venons de décrire, que certaines mutations au niveau de ces oncogènes se traduisent par des sites d'expression aberrants ou des niveaux d'expression anormalement élevés, et en conséquence, par des gains de fonction tendant à favoriser la prolifération des cellules tumorales (Figure 5). La mise en évidence et l'étude des gènes suppresseurs de

tumeurs sont plus récentes, et tendent à montrer leur intervention dans la carcinogenèse au même titre que les oncogènes.

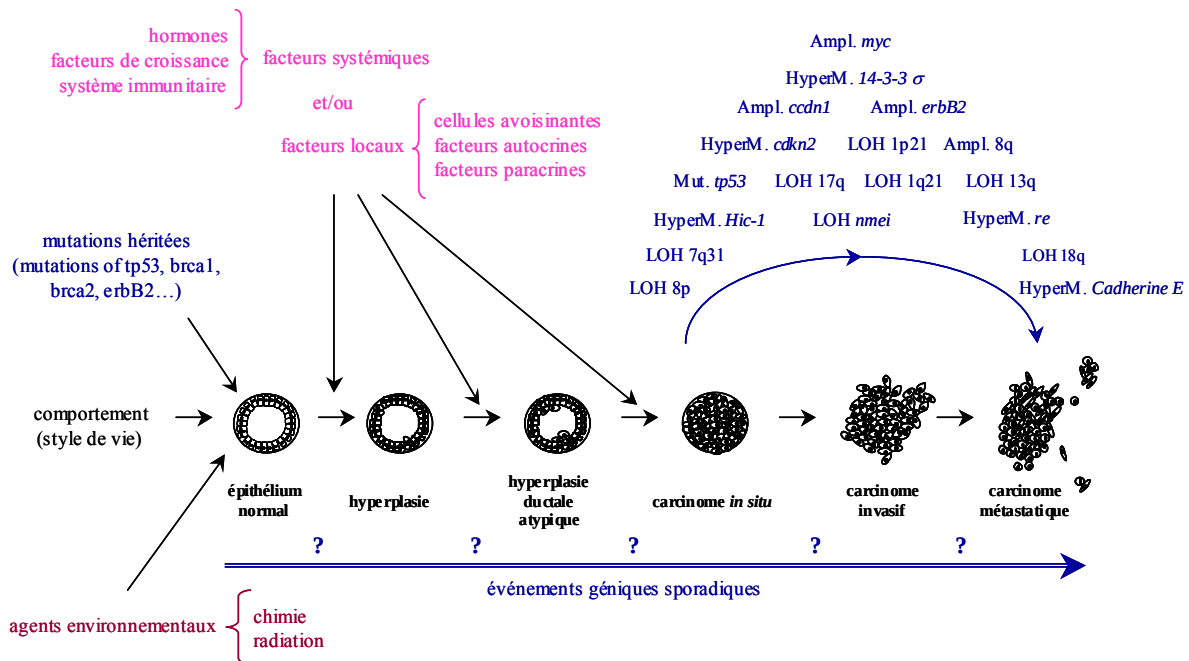


Figure 5. Schéma hypothétique des anomalies génétiques au cours de la cancérogenèse mammaire. Cette figure résume les revues : Bièche & Lidereau, 1997 ; Lakhani, 1999 ; Polyak, 2001. (HyperM. : hyperméthylation ; Ampl. : amplification ; LOH : loss of heterozygosity).

b) Inactivation de gènes suppresseurs de tumeurs

Les gènes suppresseurs de tumeurs agissent à différents niveaux de la vie de la cellule. Communément, on les subdivise en garants de la stabilité du génome (caretakers), en inhibiteurs de la croissance cellulaire au sens large (gate-keepers) et en modulateurs du microenvironnement cellulaire (landscapers). Les mutations des gènes répresseurs comme le gène *rb* (retinoblastoma), ou le gène *p53* agissent de manière récessive puisque l'inactivation du répresseur nécessite l'altération des deux allèles du gène répresseur (Knudson 1993). Plusieurs mécanismes peuvent être à l'origine de cette inactivation. Actuellement, les pertes d'hétérozygotie (ou pertes d'allèles), les mutations et les altérations épigénétiques représentent les 3 événements les plus observés dans le cancer du sein lors de l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeurs (Figure 5). Certaines pertes d'hétérozygotie ont été mises en évidence sur l'ensemble du génome des cellules cancéreuses mammaires. Cependant, certaines régions semblent plus fréquemment concernées, parmi lesquelles on peut citer les bras longs des chromosomes 1, 6, 7, 8, 11, 16, 17, 18 et 22 et les bras courts des chromosomes 1, 3, 11 et 17 (Devilee *et al.* 1997).

Des mutations ponctuelles sont également impliquées dans le processus de cancérisation inactivant les caretakers par exemple. Ainsi des mutations du gène *p53* (localisé dans la région 17q13), considéré comme l'un des gardiens du génome, sont retrouvées dans environ 15 à 60% des cancers du sein (Gasco *et al.* 2002). Cette protéine joue un rôle majeur dans le contrôle du cycle cellulaire, de la réparation et de la synthèse de l'ADN, de la différenciation et de la mort programmée. Son inactivation peut augmenter le pool de cellules en phase de prolifération ainsi que la probabilité de leur transformation maligne par inhibition du processus de l'apoptose. La transfection du gène *p53* normal dans des cellules cancéreuses mammaires, inhibe leurs divisions, démontrant son rôle suppresseur (Greenblatt *et al.* 2001). De plus, une perte d'hétérozygotie au niveau de la région 17q13, où se situe le gène *p53*, est retrouvée dans plus de la moitié des cas étudiés. Le gène *rb* (localisé au niveau de la région 13q14), premier gène suppresseur de tumeur découvert, est impliqué dans le rétinoblastome de l'enfant. Il code une protéine de 105 à 110 kDa, impliquée dans le contrôle de la croissance cellulaire et du cycle cellulaire et qui peut se lier à différentes protéines cellulaires, dont les cyclines D. On retrouve une perte d'hétérozygotie au niveau de la région 13q14 ou au niveau du gène *rb* lui-même dans environ 30% des cas. Dans environ 20% des cas, on retrouve une anomalie structurale du gène, sous forme de microdélétion ou de mutation. De plus, une perte d'expression de la protéine dans 15 à 30% des cas est également constatée.

Parmi les land-scapers, la cadhérine E et le CD44 sont les exemples les plus couramment mutés. CD44 est impliquée dans de nombreux processus de signalisation et présente de hauts taux d'expression dans de nombreuses cellules tumorales (Naot *et al.* 1997). Les cadhérines associées aux caténines relient les plaques focales d'adhésion au cytosquelette d'actine. Outre le fait que la cadhérine constitue un lien cellule-cellule, elle possède également un pouvoir de signalisation cellulaire. En effet, la E-cadhérine régule négativement l'activité de récepteurs à activité tyrosine kinase comme l'EGFR (Qian *et al.* 2004). La E-cadhérine a aussi une capacité de signalisation en stimulant, indépendamment de l'adhérence cellulaire, l'activité de la β caténine, composant de la voie Wnt (Ireton *et al.* 2002). Les cadhérines sont hormonalement régulées et contrôlent le développement mammaire normal. Cependant, leur dérégulation peut mener à des situations pathologiques. L'expression de la cadhérine E, dans les adénocarcinomes, est inversement corrélée à l'invasivité de ces tumeurs en particulier de forme lobulaire (Heimann *et al.* 2000). Ce gène est localisé en 16q22, région qui présente assez fréquemment des pertes d'hétérozygotie (Berx *et al.* 1998). En particulier, la perte de E-cadhérine est impliquée dans la transition épithélio-mésenchymateuse observée

dans le cancer du sein. On peut ainsi considérer la E-cadhérine comme un suppresseur de tumeur et un suppresseur de métastase (Cowin *et al.* 2005).

Les protéines p16^{INK4a} et p27^{KIP1}, dont les gènes sont localisés en 9p21 et 12p12 respectivement, sont des inhibiteurs spécifiques de kinases dépendantes des cyclines et sont impliquées dans la régulation du cycle cellulaire faisant ainsi partie des *gate-keepers* (Sandhu *et al.* 2000). Il existe des délétions du gène p16^{INK4a} dans 46% des lignées étudiées (Tsihlias *et al.* 1999) de même pour le gène p27.

BRCA1 (breast cancer susceptibility 1, 17q21) et BRCA2 (13q12) sont des gènes suppresseurs de tumeurs dont la mutation prédispose aux cancers du sein mais aussi de l'ovaire, du pancréas et de la prostate. Bien que les mutations de BRCA1 semblent être retrouvées dans 45% des formes familiales de cancers du sein, une mutation de BRCA est rarement retrouvée dans les formes sporadiques de cancers du sein (Futreal *et al.* 1994 ; Lancaster *et al.* 1996). Les protéines BRCA sont impliquées dans la réparation de l'ADN, l'activation transcriptionnelle d'autres suppresseurs et le contrôle du cycle cellulaire grâce à leur interaction avec rad51 (enzyme de réparation de l'ADN), p53, l'ARN polymérase II (Yoshida and Miki 2004).

c) Phénomènes épigénétiques

La Figure 5 illustre l'accumulation progressive des mutations dans le cancer du sein. Le plus souvent, ces altérations touchent les oncogènes et les gènes suppresseurs de tumeurs conduisant la cellule tumorale vers un statut de plus en plus agressif. Ces altérations se traduisent par des gains et des pertes de fonctions biologiques. Mais lors du processus de cancérogenèse, d'autres altérations peuvent avoir lieu, en particulier des altérations épigénétiques (Tlsty *et al.* 2004). En effet, l'empaquetage de l'ADN dans le noyau, sous forme de chromatine, joue un rôle essentiel dans la régulation de l'expression génique (Hu *et al.* 2005), et tend à montrer son rôle dans les modifications de l'ADN observées dans les cellules cancéreuses, expliquant ainsi la levée d'inhibition pour certains gènes ou l'effet inverse pour d'autres. L'acétylation et la méthylation sont les altérations épigénétiques les plus fréquemment retrouvées dans les tumeurs mammaires. Le degré d'acétylation des histones (protéines impliquées dans la structure de la chromatine) influence la compaction de la chromatine, et régule ainsi l'accès des facteurs généraux de transcription à l'ADN et, par conséquent, l'activité génique (Rountree *et al.* 2001). Les histones acétyl-transférases (HATs) et les histones déacétylases (HDACs) sont les enzymes impliquées dans ces processus. L'acétylation des histones crée une configuration de l'ADN accessible pour la machinerie

transcriptionnelle des gènes cibles des HATs. Par contre, la déacétylation des histones, facilite la compaction de l'ADN au détriment de la transcription. L'autre mécanisme de régulation épigénétique est la méthylation des cytosines regroupées sous la forme d'îlots CpG dans des zones d'activation (promoteurs) de la transcription de certains gènes (Rountree *et al.* 2001). Certains gènes tels que : cadhérine E, RE, cycline D2, p16, MDGI, BRCA1 ont une perte d'expression qui va de paire avec l'état de méthylation.

3) **La croissance des cellules tumorales.**

Dans la première partie, nous avons essentiellement accordé de l'importance aux hormones pour leur rôle de régulateurs de la croissance des cellules mammaires normales et abordé succinctement celui des facteurs de croissance. Dans cette partie, nous développerons plus les facteurs de croissance.

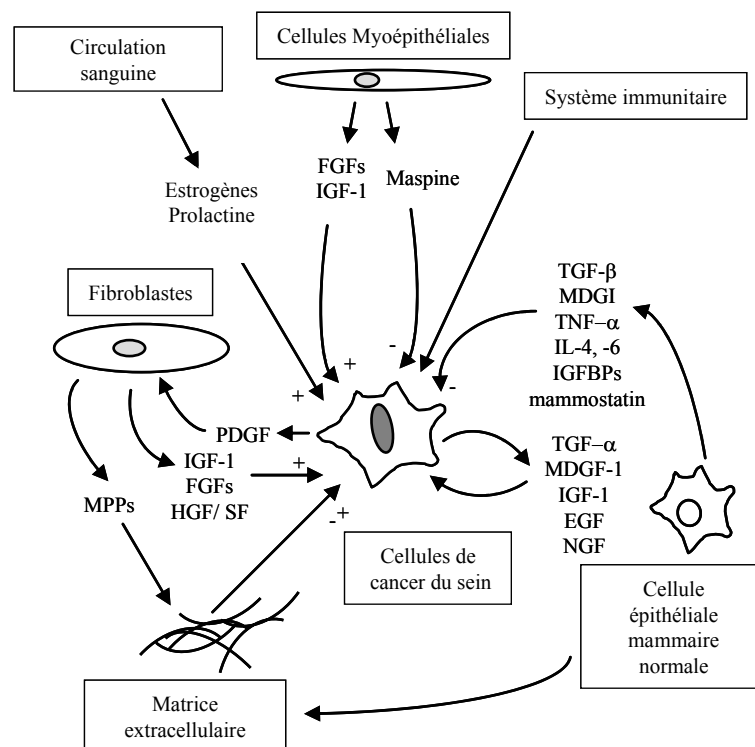


Figure 6. Régulation de la croissance de la cellule mammaire. Ce schéma résume les diverses interventions des principaux facteurs impliqués dans la prolifération maligne. A savoir : les oestrogènes, les facteurs de croissance et le microenvironnement symbolisé par la cellule mammaire normale, le fibroblaste, la cellule myoépithéliale et la matrice extracellulaire. Cet ensemble cellulaire et moléculaire est sous la dépendance de messagers intercellulaires (EGF, epidermal growth factor; FGF-2, fibroblast growth factor-2 ; HGF, hepatocyte growth factor/scatter factor; IGF, insulin-like growth factor; IGFBP, IGF binding protein; IL, interleukine; MDGF, mammary derived growth factor; MMP, matricial metalloprotease; NGF, nerve growth factor; PDGF, platelet-derived growth factor; TGF, transforming growth factor; TNF, tumor necrosis factor)

Depuis longtemps, les oestrogènes ont été considérés comme les principales hormones impliquées dans la tumorigenèse de la glande mammaire (Gardner 1959). Néanmoins, on sait aujourd'hui que de nombreux facteurs de croissance sont aussi impliqués dans ce processus (Figure 6) (Ethier 1995). Ces facteurs de croissance peuvent réguler positivement ou négativement la croissance de la tumeur mammaire (Bourhis *et al.* 2000).

a) Les facteurs de croissance inhibiteurs

Les Transforming Growth Factor β (TGF β 1, β 2 et β 3) sont des facteurs de croissance traditionnellement considérés comme des inhibiteurs de prolifération. Les lignées cellulaires de cancer du sein MCF-7, T47D et MDA-MB-231 sécrètent le TGF β , et dans les cellules hormono-sensibles, cette sécrétion est inhibée par les oestrogènes et activée par les anti-oestrogènes (Mirza 1991 ; Benson *et al.* 1996). Cependant, la plupart des lignées dérivées de tumeurs mammaires humaines invasives sont peu sensibles, voire même résistantes à l'effet inhibiteur du TGF β (Knabbe *et al.* 1987 ; Arteaga *et al.* 1988). Le TGF β appartient à la même famille que l'EGF et il est sécrété par les lignées de cellules de cancer du sein, agissant de manière autocrine sur les cellules productrices, ou de manière paracrine sur les cellules voisines.

Les Insulin-like Growth Factor Binding Proteins (IGFBPs) régulent négativement la disponibilité des Insulin-like Growth Factors (IGFs) qui sont mitogènes pour les cellules cancéreuses du sein. *In vitro*, toutes les cellules cancéreuses mammaires sécrètent des IGFBPs alors que dans les tumeurs sont exprimées préférentiellement les IGFBP-1 et -7 (Figueroa et Yee 1992). La fonction de ces Insulin-like Growth Factor Binding Proteins dans la régulation de la prolifération des cellules tumorales mammaires est encore mal comprise, mais ces protéines semblent pouvoir agir d'une manière dépendante et indépendante des IGFs (Bourhis *et al.* 2000). Le Mammary Derived Growth Factor Inhibitor (MDGI) est fortement exprimé lors de la lactation dans les cellules épithéliales au niveau desquelles il serait impliqué dans le processus de différenciation. *In vitro*, il inhibe la croissance des cellules épithéliales humaines normales et tumorales (Lehmann *et al.* 1989).

Il existe d'autres molécules responsables de l'inhibition de la prolifération des cellules épithéliales telles que les mammostatines qui ne sont sécrétées que par les cellules épithéliales normales et qui agissent sur les cellules cancéreuses mammaires. Une autre molécule connue pour inhiber la prolifération est le TNF α (Tumor Necrosis Factor-alpha) qui est cytotoxique pour les cellules épithéliales malignes alors qu'il affecte peu la viabilité des cellules normales.

Certaines interleukines sont classées dans cette liste d'inhibiteurs de prolifération, comme les IL-1, -4, -6 et -8. Elles sont produites par les cellules normales et tumorales, et, par exemple, l'IL-6 inhibe seulement la croissance des lignées cellulaires de cancer du sein hormono-sensibles (Bourhis *et al.* 2000).

b) Les facteurs de croissance activateurs :

Les Insulin-like Growth Factors comme IGF-I et IGF-II sont de puissants mitogènes pour les lignées cellulaires tumorales mammaires qui expriment leur récepteur (Peyrat *et al.* 1990). L'IGF-I sécrété par les fibroblastes du stroma agit de manière paracrine sur les cellules épithéliales et sa présence dans le plasma augmente chez les patientes atteintes d'une tumeur mammaire primaire par rapport aux sujets sains (Peyrat *et al.* 1993). L'IGF-II peut être sécrété par les lignées tumorales hormono-dépendantes T47-D et MCF-7 sous l'influence des oestrogènes (Yee *et al.* 1989).

Le Platelet-derived Growth Factor (PDGF) est synthétisé par les plaquettes, mais aussi par les fibroblastes. Il présente deux sous unités protéiques : la sous unité A et la sous unité B, et il agit sous forme d'homodimères (AA, BB) et d'hétérodimères (AB). Les cellules tumorales humaines T47D expriment les récepteurs du PDGF (α et β) et sont stimulées par le PDGF-AA et le PDGF-AB. Contrairement aux cellules mammaires normales qui sécrètent préférentiellement le PDGF-AA, les cellules tumorales sécrètent surtout le PDGF-BB (Bronzert *et al.* 1987).

L'Epidermal Growth Factor (EGF) est le facteur de croissance le plus étudié dans le cancer du sein. L'EGF stimule la prolifération des cellules épithéliales mammaires tumorales *in vitro* (Coleman et Daniel 1990). La surexpression de EGF-R ou HER2/Neu est détectée dans 20 à 40% des tumeurs mammaires et correspond à des tumeurs résistantes au tamoxifène, traitement hormonal anti-oestrogène (Hutcheson *et al.* 2003). Le ciblage du récepteur orphelin à l'EGF, HER2/Neu, a abouti à la mise au point d'un traitement rationnel des cancers du sein métastatiques grâce à un anticorps monoclonal appelé trastuzumab (Herceptin). Ce traitement est utilisé maintenant en routine clinique pour traiter les 25% de cancers du sein surexprimant HER2/Neu (Vogel *et al.* 2005).

L'Hepatocyte Growth Factor/ Scatter Factor (HGF/ SF) est le facteur de croissance motogène par excellence. Il se lie à un récepteur de type tyrosine kinase composé de deux sous unités formant un hétérodimère. L'HGF/ SF est également angiogène, mitogène et anti-apoptotique. Ainsi, il a été reporté que les cellules cancéreuses sécrètent du FGF-2 et du PDGF qui entraînent une augmentation de la synthèse d'HGF/SF par les fibroblastes.

L'HGF/SF sécrété par les fibroblastes stimule alors la prolifération et l'invasion des cellules cancéreuses ainsi que l'angiogenèse en agissant sur les cellules endothéliales (Nakamura *et al.* 1997). Dans les cancers du sein, la quantité d'HGF/ SF est plus importante dans la tumeur que dans le tissu adjacent et le taux d'HGF/ SF circulant est augmenté chez 60% des patientes présentant des métastases (Yamashita *et al.* 1994). L'augmentation de l'HGF/ SF est par ailleurs corrélée à un mauvais pronostic (Toi *et al.* 1998).

L'étude du Nerve Growth Factor (NGF) et des neurotrophines dans le cancer du sein est maintenant la thématique de notre laboratoire. Il a été découvert dans notre laboratoire que le NGF a 2 activités biologiques distinctes sur les cellules cancéreuses mammaires: un effet mitogène *via* la voie des MAPKs (Descamps *et al.* 1998) et un effet anti-apoptotique *via* la voie NFκB (Descamps *et al.* 2001 ; El Yazidi-Belkoura *et al.* 2003). Compte-tenu de la sécrétion de NGF par les cellules de cancer du sein et du fort impact de cette autocrinie sur la croissance des cellules de cancer du sein, le NGF et sa signalisation ont été proposés comme cibles thérapeutiques (Dolle *et al.* 2003 ; Dolle *et al.* 2004). Inversement, la perte d'expression et d'activation des récepteurs au NGF correspond à une progression de la tumeur vers des stades très invasifs et agressifs (Davidson *et al.* 2004). Ces données laissent à penser que l'effet du NGF est important durant les premiers stades de développement du cancer du sein.

Remarquons que l'ensemble des facteurs de croissance activateurs évoqués ici sont également capables de stimuler la kinase Akt, que ce soit dans des cellules de cancer du sein ou dans un autre modèle cellulaire. La famille des Fibroblast Growth Factors (FGFs) qui concerne plus particulièrement mon travail de thèse sera abordée dans le chapitre suivant des généralités.

CHAPITRE 2: LE FGF-2, SES RECEPTEURS ET SA SIGNALISATION JUSQUE LA PI3K

I. LES FGFS

Cette famille de facteurs de croissance contient 23 membres de masses moléculaires comprises entre 17 et 34 kDa. Les membres les plus étudiés de cette famille restent le FGF-1 (FGF acide) et le FGF-2 (FGF basique) qui ont 55 % d'homologie de séquence (Ornitz et Itoh 2001; Popovici *et al.* 2005). Les FGFs stimulent la prolifération et la différenciation des cellules d'origines mésodermique et neur ectodermique et modulent la différenciation, la migration et la survie cellulaire. (Ornitz et Itoh 2001) ce qui les rend importants pour le développement embryonnaire, l'angiogenèse, la réparation et la régénération tissulaire et bien entendu dans la tumorigenèse.

II. LE FGF-2

Peu d'études sont focalisées sur la structure des gènes et des protéines des FGFs. Seuls les FGF-1 et 2 sont bien décrits. Comme notre étude a essentiellement porté sur l'effet anti-apoptotique du FGF-2 via la voie de signalisation PI3K/Akt, je ne décrirai que les données concernant le FGF-2. Le FGF-2 a été isolé la première fois à partir de glande pituitaire grâce à son effet mitogène sur les fibroblastes NIH-3T3 (Gospodarowicz *et al.* 1974). Le gène du FGF-2 est situé en 4q26 (Mergia *et al.* 1986). La région codante de ce gène contient 3 exons. Le gène FGF-2 de 35 kb code des ARN messagers de 4,6 à 2,2 kb. Contrairement au FGF-1 les ARN polyadénylés du FGF-2 présentent plusieurs sites d'initiation de la traduction pour 5 protéines aux effets biologiques différents (Okada-Ban *et al.* 2000).

Le promoteur du gène du FGF-2 ne contient pas de TATA box mais 5 boîtes GC (sites putatifs de fixation du facteur de transcription Sp1) et un site putatif de fixation pour AP-1 (Activator Protein 1) (Shibata *et al.* 1991). Stabchowiach et collaborateurs ont montré grâce à un vecteur rapporteur luciférase placé sous le contrôle de ce promoteur que la région -650 à +314 est suffisante pour une activation par des facteurs de croissance (EGF, PDGF), par la protéine kinase C (PKC) ou par l'AMPc (Moffett *et al.* 1998). Le promoteur du gène du FGF-2 possède aussi un élément de réponse aux facteurs de croissance (GFRE, Growth Factor Response Element) en -555 -512 pb.

Un ARNm antisens gfg2 de 1,5 kb complémentaire de la région UTR 3' de l'ARNm du FGF-2 a été décrit chez le Xénope (Volk *et al.* 1989), le poulet (Volk *et al.* 1989), et le rat (Li *et al.* 1996). Chez l'humain il a été détecté dans de nombreux tissus tels que cœur, colon, foie, muscles squelettiques, testicules et ovocytes et dans des lignées cellulaires de sein (T47-D) et de glioblastome (U87-MG) (Murphy *et al.* 1994). L'hypothèse avancée est que cet ARN antisens régulerait polyadénylation et demi-vie en s'hybridant avec l'ARNm FGF-2. Sur des cellules en culture il est capable de diminuer la synthèse du FGF-2 et par cela d'inhiber la prolifération des cellules musculaires (Schmidt *et al.* 1997). *In vivo*, il est capable de diminuer l'angiogenèse.

Le site classique d'initiation de la traduction avec l'AUG en position 484 code le FGF-2 de 18 kDa (155 acides aminés). Trois sites CUG en position 319, 346 et 361 codent respectivement des protéines de 24 (210 acides aminés), 22,5 (201 acides aminés) et 22 kDa (196 acides aminés) (Florkiewicz et Sommer 1989; Prats *et al.* 1992). Un quatrième CUG en 86 code un FGF-2 de 34 kDa découvert plus récemment (Arnaud *et al.* 1999). Seule la forme de 18 kDa sans NLS (nuclear localization sequence) est retrouvée dans le cytoplasme et sécrétée alors que les 4 autres formes avec NLS sont retrouvées principalement dans le noyau (Bugler *et al.* 1991 ; Arnaud *et al.* 1999). Le FGF-2 que nous avons utilisé pour stimuler les lignées de cancer du sein en culture est une forme recombinante de ce FGF-2 de 18 kDa normalement sécrété.

Le FGF-2 est un polypeptide basique, globulaire non-glycosylé et de point isoélectrique 9,6. Structurellement FGF-1 et -2 appartiennent à la famille de l'interleukine 1 (IL-1) par leur structure en pyramide trigonale : 11 feuillets beta forment 3 groupes de 3 à 4 feuillets anti-parallèles reliés par des ponts hydrogènes (Zhu *et al.* 1991). Le cœur aromatique de la protéine très conservé parmi les FGFs est très hydrophobe alors que sa surface riche en acides aminés basiques (Lysine et Arginine) lui confère un point isoélectrique très basique. Les résidus cystéines 69 et 87 permettent une dimérisation du FGF-2 (Zhang *et al.* 2001).

Ces propriétés font du FGF-2 un messager facilement diffusible dont nous allons maintenant décrire l'action sur les cellules de cancer du sein.

III. FGF-2, TRANSFORMATION CELLULAIRE ET DEVELOPPEMENT TUMORAL

Le FGF-2 est capable de transformer un bon nombre de types cellulaires (Basilico et Moscatelli 1992). Plus particulièrement, les cellules hormono-dépendantes MCF-7

transfectées par le FGF-1, 2 ou 4 deviennent tumorigènes lorsqu'elles sont injectées à des souris *nude* et provoquent l'apparition de métastases et de nombreux vaisseaux sanguins de part le rôle autocrine du FGF-1 sur les cellules tumorales (Souttou *et al.* 1996 ; Zhang *et al.* 1999), et ce même en traitant les animaux par l'anti-oestrogène Tamoxifen (McLeskey *et al.* 1993; McLeskey *et al.* 1996; McLeskey *et al.* 1998). Par contre, il a également été décrit que la transfection des cellules hormono-indépendantes de cancer du sein T-47D par la forme de 18 kDa du FGF-2 inhibe leur potentiels migratoires et invasifs (Korah *et al.* 2000). Le FGF-2 n'a pas qu'un rôle de facteur de croissance motogène ou angiogène mais il stimule la prolifération des cellules de cancer du sein seul ou en synergie avec les hormones oestrogéniques et les IGFs (Garnier *et al.* 2003). Cependant, peu de données sont disponibles concernant un effet du FGF-2 sur la survie des cellules de cancer du sein. C'est ce constat qui nous a amené à étudier l'effet du FGF-2 sur l'apoptose des cellules de cancer du sein.

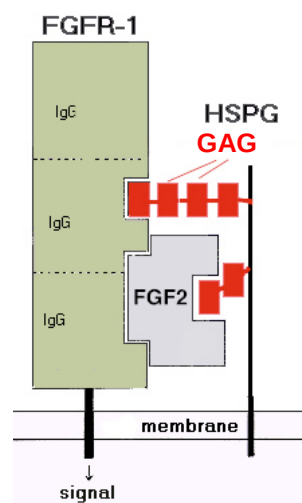


Figure 7. Représentation de l'interaction ternaire du FGF-2 avec le FGFR et les chaînes d'héparanes sulfates. Le site de fixation des héparasulfates protéoglycannes se situe entre les premières et deuxièmes boucles immunoglobulines du FGFR et sur la molécule de FGF-2. Les HS peuvent se fixer au FGF-2 de telle sorte qu'ils interagissent aussi avec le FGFR. D'après Presta *et al.* 2000 (FGF-2, fibroblast growth factor-2 ; FGFR, FGF receptor ; GAG, glycoaminoglycans ; HSPG, heparane sulfate proteoglycannes)

IV. LES RECEPTEURS AU FGF

Deux types de récepteurs pour le FGF ont été décrits :

- o Des récepteurs à activité tyrosine kinase et à forte affinité (Kd 10-600 pM) appelés FGFRs.

- o Des récepteurs de type héparanes sulfates (HSPG) à faible affinité (2-20 nM) appelés aussi récepteurs accessoires qui ne semblent pas transduire un signal mais serviraient de régulateurs positifs ou négatifs en présentant ou en cachant le FGF aux FGFRs.

A. Récepteurs à activité tyrosine kinase (FGFRs)

Les FGFRs comprennent une vingtaine d'isoformes codés par 4 gènes : *flg*/FGFR-1, *bek*/FGFR-2, *cek2*/FGFR-3 et FGFR-4 portés respectivement par les chromosomes 8, 10, 4 et 5 (Friesel et Maciag 1995). La plupart des isoformes proviennent de FGFR-1 et 2. La variabilité des isoformes se situe surtout sur leur domaine extracellulaire ce qui explique une spécificité de ligand. Le FGF-2 que nous utilisons se fixe fortement sur les récepteurs FGFR-1c, 3c et 4, moyennement sur les isoformes 1b et 2c et un peu sur l'isoforme 2b.

Les FGFRs sont des protéines transmembranaires glycosylées avec un domaine extracellulaire à deux ou trois boucles type immunoglobuline, une séquence de sécrétion en N-terminal et une séquence juxtamembranaire côté C-terminal. Le domaine extracellulaire contient six à neuf sites de N-glycosylation (Dionne *et al.* 1990). Le domaine intracellulaire contient un domaine juxtamembranaire, une séquence C-terminale et deux domaines à activité tyrosine kinase interrompus par une courte séquence (insert).

Le domaine kinasique est composé d'un site de fixation de l'ATP séparé du domaine catalytique par un insert de 14 acides aminés. La séquence de ce dernier diffère parmi les FGFRs, alors que les deux domaines adjacents sont très conservés. Ce domaine intracellulaire du récepteur est primordial pour l'activité des FGFs. En effet, la mutation de certains résidus ou la troncation de cette région est corrélée à une forte diminution de l'activation des voies de signalisation et de l'activité biologique des FGFs comme la transformation cellulaire des fibroblastes NIH3T3 (Li *et al.* 1994) ou l'effet mitogène (Wang *et al.* 1997). De plus, des mutations naturelles de résidus basiques adjacents au site d'autophosphorylation dans le FGFR-3 le rendent autoactivable en absence de ligand (Mohammadi *et al.* 1996) provoquant des troubles profonds du développement osseux responsables de maladies génétiques létales (Mohammadi *et al.* 1996).

Les sites de trans-autophosphorylation nécessaires à l'activation des FGFRs sont différemment conservés: les Tyr-463 et -585 sont trouvées dans les FGFR-1 et R2, la Tyr-583 dans les FGFR-1 à R3, et les Tyr-730 et -766 dans les quatre FGFRs (Mohammadi *et al.* 1996). Une étude réalisée à partir de récepteurs FGFR chimères (domaine extracellulaire du récepteur du PDGF β et domaines transmembranaire et intracellulaire du FGFR-1, R3 ou R4)

aboutit à la conclusion que les différents FGFRs n'activent pas leurs voies de signalisation avec les mêmes intensités relatives et aboutissent à des réponses cellulaires différentes (Foehr *et al.* 1998). Ces différences subtiles qui existent entre les domaines cytoplasmiques des FGFRs leur confèrent pourtant une signalisation et des activités biologiques différentes.

La surexpression de certaines molécules dans les cancers peut également conduire à la suractivation du FGFR. Un bon exemple est la N-cadhérine. La N-cadhérine se lie au FGFR et retarde son internalisation/dégradation après stimulation. La surexpression de la N-cadhérine conduit donc à une activation plus longue du FGFR qui se traduit notamment par une plus grande capacité métastatique de la cellule de cancer du sein (Suyama *et al.* 2002). De la même façon, la liaison de la E-cadhérine et du FGFR ralentit l'internalisation du FGFR, sa translocation nucléaire et suractive les MAPKs en aval du FGFR (Bryant *et al.* 2005).

Il faut également noter qu'une hétérodimérisation est possible entre des récepteurs de types différents (R1, R2, R3, R4) et/ou résultant d'un épissage alternatif (formes alpha ou beta, formes IIIb ou IIIc) qui peut modifier considérablement l'affinité et l'activité des FGFs (Bellot *et al.* 1991 ; McKeehan et Kan 1994). Si l'on prend en compte ces deux phénomènes, suivant le type cellulaire, l'intégration du signal FGF peut se faire par des combinaisons multiples de dimères de récepteurs ; d'où une régulation extrêmement fine de la signalisation induite par le FGF et une réponse variant entre types cellulaires.

B. Récepteurs de type héparane sulfate protéoglycannes

Les protéoglycannes de type héparanes sulfates (HSPG) sont des molécules de haut poids moléculaire représentant un site de liaison de basse affinité des FGFs (1-10 nM pour le FGF-2) (Burgess et Maciag 1989). Les HSPG sont produits par les cellules qui les présentent à leur surface et les rejettent dans la matrice extracellulaire (Kjellen et Lindahl 1991). Les HSPGs interagissent avec le FGF-2 pour moduler sa distribution et son activité biologique (Iozzo 1998).

1) Structure des HSPGs

Les HSPGs sont composés d'un axe protéique sur lequel est greffé, par liaison O-glycosidique, un nombre variable de glycosaminoglycannes de type héparanes sulfates. Les héparanes sulfates sont des répétitions 50 à 150 fois de motifs disaccharidiques (un acide hexuronique et une D-Glucosamine). Les glycosaminoglycannes sont plus ou moins sulfatés

ce qui contribue encore à leur diversité. Trois types de HSPGs fixent le FGF-2 : le syndecan, le perlecan et le glypican.

2) Modulation de la réponse au FGF par les HSPGs

Le rôle des HSPGs dans la signalisation du FGF-2 est désormais confirmé. Les sites de fixation de basse affinité stabilisent le complexe ligand/récepteur et participent directement à la formation de complexe multimérique, intervenant de ce fait dans la signalisation du FGF-2 en stimulant ou en inhibant, suivant leur nature et leur proportion, l'action du FGF-2 (Zhang *et al.* 2001 ; Ibrahimi *et al.* 2004). Cet effet ambivalent peut s'expliquer par le modèle d'interaction des molécules sulfatées avec le FGF-2 et les FGFRs présenté dans la Figure 7 (Zhang *et al.* 2001) dans lequel les HS établissent un pont entre les deux complexes FGF-2-FGFR. En effet, à concentration optimale, l'héparine fixe simultanément deux molécules de FGF-2, facilitant leur fixation sur un dimère de FGFR. Mais en excès, l'héparine, qui ne fixe alors plus qu'une seule molécule de FGF-2, interdisant la formation des dimères de FGF-2. D'autres travaux supportent le modèle dans lequel les HS ne sont pas absolument indispensables pour la signalisation du FGF-2 mais la facilitent en augmentant le temps d'association entre le FGF-2 et le FGFR (Padera *et al.* 1999). Une étude a montré que les cellules cancéreuses mammaires MDA-MB-231 ne sont que peu sensibles au FGF car les elles présentent à leur surface une grande quantité de HSPG sulfatés inhibiteurs. C'est pourquoi nous n'avons pas utilisé cette lignée pour étudier l'effet du FGF-2.

V. ACTIVATION DE LA PI3K PAR LE FGFR

Les signaux de transduction induits par les FGFs sont multiples, complexes et différents selon le type cellulaire étudié. Ils ne se limitent pas à l'activation de la voie PI3K/Akt. L'ensemble de cette signalisation est rassemblé dans la Figure 8. Mon travail se portant sur l'étude de la signalisation de la kinase Akt je ne détaillerai que le mode d'activation de la PI3K, activateur de Akt.

Les cascades de signalisation formées par les réseaux de protéines kinases permettent à la cellule d'intégrer rapidement les signaux extracellulaires. Ces protéines de signalisation contiennent souvent des domaines conservés qui ne possèdent pas d'activité catalytique, les domaines SH2 et SH3. Le domaine SH2 (Src Homology 2) composé d'une centaine d'acides aminés, participe directement à la fixation du substrat en reconnaissant des courtes séquences peptidiques contenant des tyrosines phosphorylées. Quant aux domaines SH3, ils sont

responsables de l'interaction protéine-protéine en se fixant sur des courtes séquences peptidiques riches en proline. Les protéines à domaine SH2 sont subdivisées en deux classes : la classe I qui porte une activité enzymatique comme les protéines Src, PLC, ou PKC, et la classe II qui est représentée par les adaptateurs comme Grb2, Shc, ou Nck, dans lesquels le domaine SH2 est associé avec d'autres régions conservées et sans activité catalytique. L'ensemble de ces protéines joue un rôle primordial dans la transduction des voies de signalisation dont nous allons maintenant étudier le détail en ce qui concerne l'activation de la PI3K par le FGF-2.

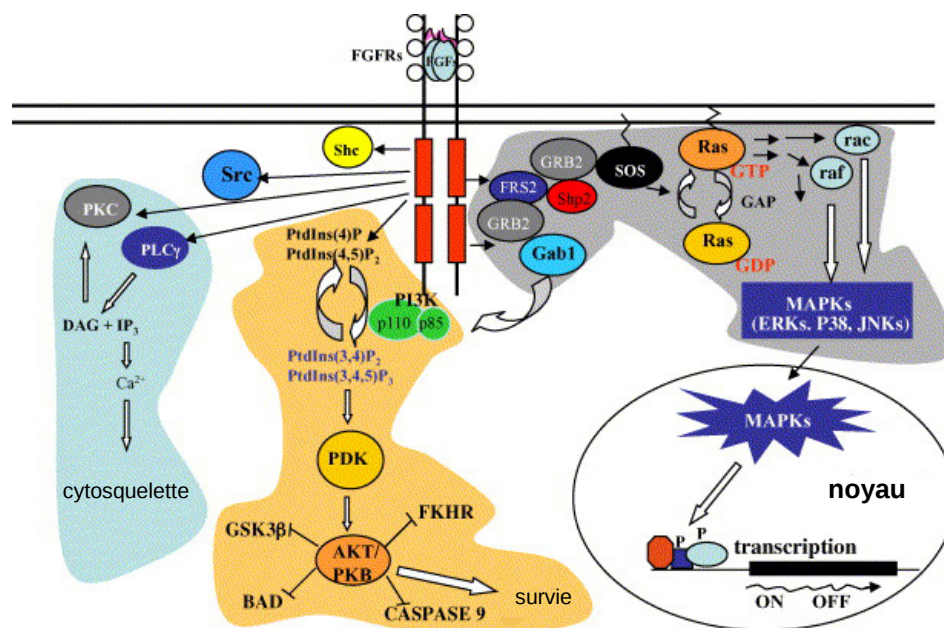


Figure 8. Principales voies de signalisation en aval du récepteur FGFR. (DAG, diacylglycerol ; FKHR, forkhead ; FRS2, FGF receptor substrate 2 ; gab1, Grb2-associated binder 1 ; Grb2, growth factor receptor-bound protein 2 ; GSK3, glycogen synthase kinase 3 ; JNK, c-jun N-terminal kinase ; MAPK, mitogen-activated protein kinase ; PDK, phosphatidylinositol-dependent kinase ; PI3K, phosphatidylinositol 3-kinase ; PKB, protein kinase B ; PKC, calcium-dependent protein kinase ; PLC, phospholipase C ; rac, reorganization of actin cytoskeleton ; G(T/D)P, guanosine di/tri phosphate ; Shc, src homologous and collagen ; Shp2, structurally related phosphatase 2 ; sos, son of sevenless ; Src, sarcoma). Tirée de Dailey *et al.* 2003.

A. Les protéines adaptatrices

En aval des récepteurs à activité tyrosine kinase tels que le FGFR, on trouve des protéines adaptatrices qui s'associent aux tyrosines phosphorylées du récepteur activé par des domaines SH2 (Src Homology-2) ou, dans le cas de FRS2, par un domaine de fixation des phosphotyrosines, le domaine PTB (Figure 9). Ces protéines établissent la liaison entre le

signal membranaire et le signal intracellulaire. Les protéines adaptatrices permettant l'activation de la PI3K sont grb2, gab1, et FRS2.

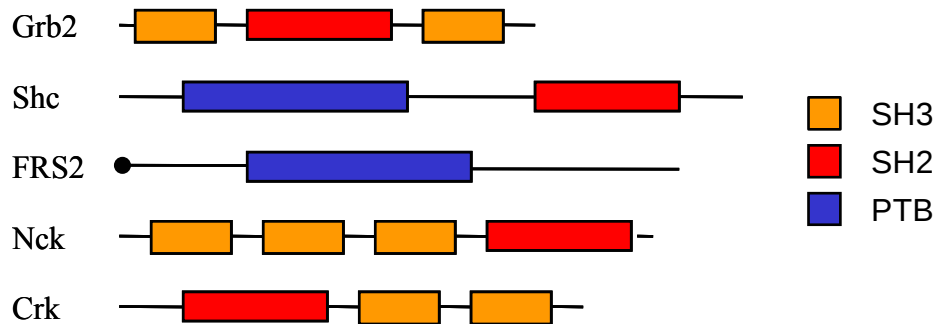


Figure 9. Organisation structurale des protéines adaptatrices du FGFR. (Crk, chicken related kinase ; FRS2, FGF-receptor substrate 2 ; Grb2, growth factor receptor-bound protein 2 ; PTB, phosphotyrosine binding ; SH, src-homology ; Shc, src homologous and collagen ; SH, src-homology ; •, site de N-myristoylation en N-terminal de FRS2)

1) *Growth factor Receptor Binding protein-2*

Grb2 (Growth factor Receptor Binding protein) est une protéine de 23 kDa qui se fixe aux récepteurs des facteurs de croissance par un domaine SH2. Grb2 contient également deux domaines SH3 intervenant dans la fixation du facteur d'échange de nucléotide guanosine Sos (Son of Sevenless), Grb2 et Sos étant constitutivement associés. Ce complexe Grb2-Sos peut activer la protéine Ras directement ou par l'intermédiaire d'autres adaptateurs tels que Shc ou FRS2.

2) *FGF Receptor Substrate-2*

La protéine FRS2 (FGF Receptor Substrate-2) est une protéine ubiquitaire d'environ 90 kDa qui sert de pont entre le FGFR et les protéines de signalisation. Deux membres de la famille de FRS2 ont été décrits, FRS2 α et FRS2 β , avec une homologie de séquence de 49% (Xu *et al.* 1998). FRS2 contient un site de myristoylation en N-terminal qui permet la localisation membranaire de FRS2 nécessaire à sa phosphorylation, un domaine de fixation des phosphotyrosines (PTB domain) et quatre tyrosines phosphorylées en C-terminal qui recrutent les protéines à domaines SH2 (Kouhara *et al.* 1997). Les protéines FRS2 ne contiennent donc pas à proprement parler de région SH2, mais c'est le domaine PTB qui reconnaît les tyrosines phosphorylées. L'activation de FRS2 est spécifique du FGF et du NGF

et elle est impliquée aussi bien dans des processus de différenciation que de prolifération induits par ces facteurs de croissance (Gotoh *et al.* 2004). La tyrosine-phosphorylation de FRS2 est dépendante de la fixation du ligand et de l'activation du FGFR (Ong *et al.* 2000). Une fois phosphorylé, FRS2 sert de pontage entre le récepteur et la voie de Ras-MAPK en recrutant le complexe Grb2-Sos soit directement via le domaine SH2 de Grb2 (Ong *et al.* 1996 ; Ward *et al.* 1996), soit indirectement par l'intermédiaire de Shc (Kanai *et al.* 1997) ou de la phosphatase Shp2 (Hadari *et al.* 1998).

3) ***Grb2 associating binder (gab)***

Gab est une protéine adaptatrice de la famille des « Gab/Daughter of sevenless » qui amplifie et intègre les signaux des RTKs. Cette protéine est un véritable lien entre facteurs de croissance et hormones pour la régulation des cellules de cancer du sein puisque *gab2* est surexprimé dans les cellules de cancer du sein ; surexpression qui est encore accentuée par le traitement des cellules de cancer du sein hormono-dépendantes par l'oestradiol (Daly *et al.* 2002). La surexpression de *gab2* hypersensibilise les cellules cancéreuses mammaires aux facteurs de croissance en particulier au FGF-2. Les rôles principaux de *gab* dans la signalisation cellulaire sont l'activation de ras et de la PI3K.

B. Activation de la PI3K

La PI3K est une protéine hétérodimérique composée d'une sous-unité régulatrice de 85 kDa (p85) et d'une sous-unité catalytique de 110 kDa (p110). La sous-unité p85 contient deux domaines SH2 qui peuvent se fixer sur les récepteurs tyrosine-phosphorylés et recruter alors le complexe p85-p110 près de la membrane cellulaire. Une fois activée, la sous-unité p110 phosphoryle des composés phosphoinositols. Certains récepteurs de facteurs de croissance comme le FGFR possèdent les sites de fixation pour un recrutement direct de la PI3K alors que d'autres comme le récepteur à l'insuline ne possèdent pas de tels sites de fixation et s'associent indirectement avec la PI3K via IRS (insulin receptor substrate) dont la phosphorylation par le récepteur activé permet le recrutement du domaine SH2 de la PI3K (Yenush *et al.* 1998).

Grb2 (Holgado-Madruga *et al.* 1997), Gab1 (Korhonen *et al.* 1999 ; Rodrigues *et al.* 2000 ; Schaeper *et al.* 2000) et Gab2 (Gu *et al.* 1998 ; Gu *et al.* 2000) sont aussi des protéines adaptatrices capables de recruter la PI3K en réponse aux facteurs de croissance (NGF, HGF, EGF). Ong et collaborateurs (Ong *et al.* 2001) ont montré que le recrutement de la PI3K par le

FGFR se fait très indirectement via un complexe FRS2/Grb2 /Gab1. Lors de la stimulation du récepteur, FRS2 est recruté et phosphorylé par le récepteur, le domaine SH2 de Grb2 se fixe aux tyrosines phosphorylées de FRS2 et son domaine SH3 recrute Gab1 qui est à son tour phosphorylé par le récepteur FGFR de façon à générer des sites de liaison pour la sous-unité p85 de la PI3K. De façon intéressante Grb2 en complexe avec FRS2 est capable également de recruter sos1 activateur de la voie des MAPK. Le complexe FRS2/Grb2 constituerait donc une véritable bifurcation entre les voies de signalisation PI3K/Akt et MAPK dont la balance pencherait en faveur des adaptateurs les plus disponibles.

CHAPITRE 3: LA KINASE AKT

Akt/PKB est une sérine/thréonine kinase appartenant à la super famille des cAMP-dependent protein kinase A/ protein kinase G/ protein kinase C (superfamille des AGC kinases). Les kinases de cette superfamille partagent une grande similarité dans leur domaine catalytique et dans leur mode d'activation.

I. GENES DE AKT

C-Akt est l'homologue cellulaire de l'oncogene transformant du retrovirus AKT8 qui induit des lymphomes chez la souris (Staal *et al.* 1977; Staal 1987; Bellacosa *et al.* 1991; Bellacosa *et al.* 1993); d'où le nom de Akt. Le gène viral *v-akt* résulte en fait de recombinaisons des séquences gag virales codant des antigènes de membrane (*gag*, group-specific antigen), et du gène Akt cellulaire. Au moment de l'identification de *c-Akt*, des protéines kinases ont été clonées par une démarche de recherche d'homologie avec le domaine actif des PKA et PKC c'est pourquoi on les a appelées protein kinase B (PKB) et related to A and C protein kinases (RAC-PK) (Coffer et Woodgett 1991; Jones *et al.* 1991). Par la suite, il a été découvert que les protéines PKB α et RAC-PK α sont encodées par le même gène maintenant appelé Akt. Depuis, deux nouveaux gènes de la famille Akt ont été identifiés c-Akt2/PKB β /RAC-PK β et Akt3/PKB γ /RAC-PK γ (Staal 1987; Konishi *et al.* 1995; Cheng *et al.* 1996; Nakatani *et al.* 1999). Les localisations chromosomiques des 3 différents gènes de Akt sont respectivement 14q32, 19q13 et 1q43 (Figure 10).

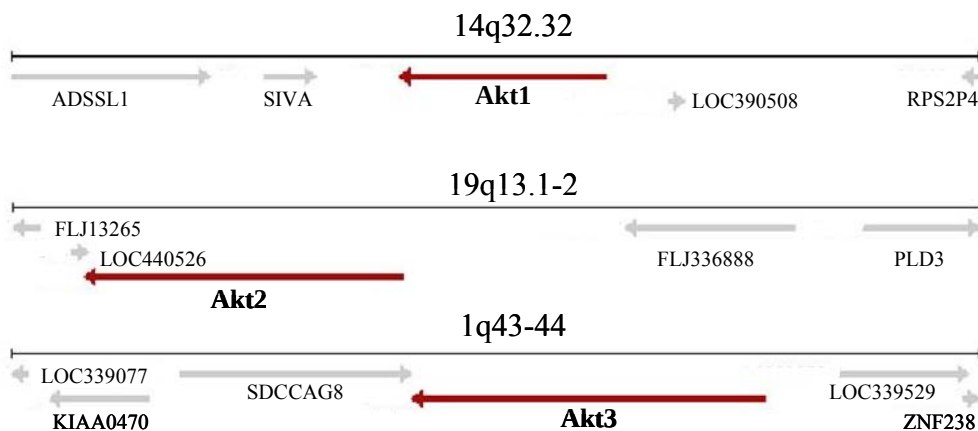


Figure 10. Situation génomique des trois gènes Akt. Sont indiqués les gènes et loci juxtant les trois gènes de Akt sur l'ADN génomique (LOC, locus, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi>).

II. TRANSCRITS DE AKT

Akt1 possède trois transcrits (Figure 11) différents du fait d'un épissage alternatif différent dans l'UTR 5' (untranslated region 5'). Toutefois cet épissage n'a que peu d'importance car les 3 transcrits codent la même protéine. Akt2 ne possède qu'un seul transcrit. Akt3 possède deux transcrits qui diffèrent par l'épissage d'une partie en 3'. Il en résulte deux protéines Akt3 dont une est tronquée dans la partie C-terminale.

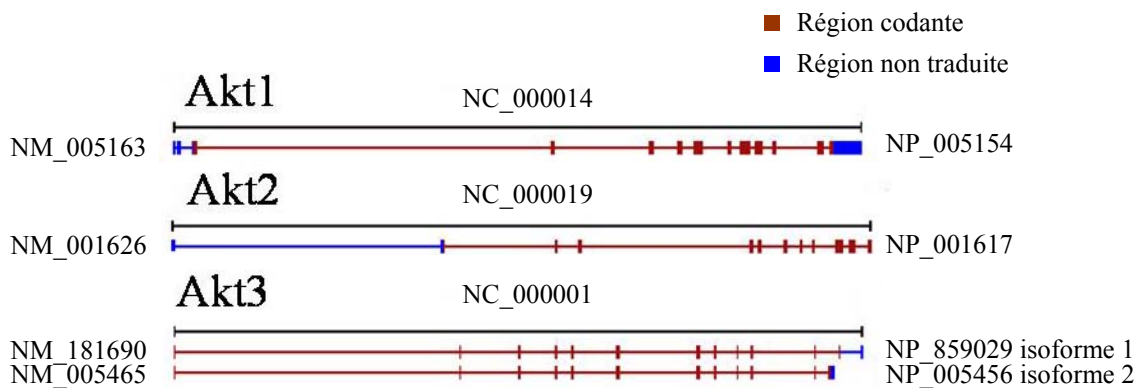


Figure 11. Transcrits des 3 gènes de Akt. Sont indiquées en rouge les régions codantes des ARNm et en bleu les régions non traduites. Seule Akt3 a des transcrits donnant des isoformes différents. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi>).

III. STRUCTURE DE LA PROTEINE AKT

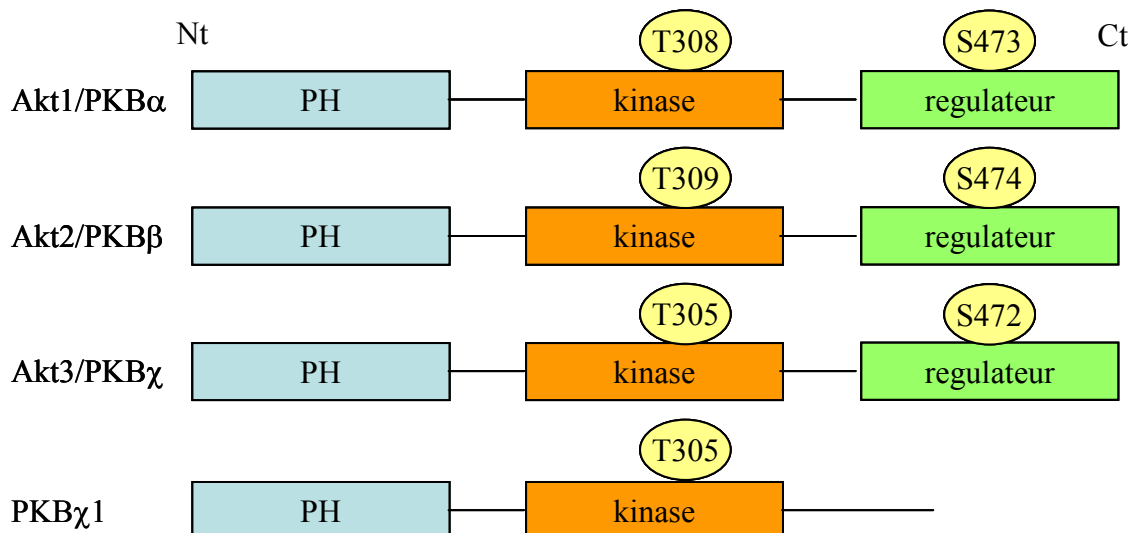


Figure 12. Structure schématisée des isoformes de Akt chez l'humain. Sont schématisés le domaine PH, le domaine à activité kinase (kinase), le domaine régulateur (régulateur) ainsi que les 2 sérines et thréonines dont les phosphorylations sont nécessaires à l'activation de Akt (PH, pleckstrin homology ; PKB, protein kinase B). D'après Song *et al.*, J. Cell. Mol. Med. 2005.

Les 3 protéines de la famille Akt contiennent un domaine sérine/thréonine kinase central, un domaine PH en N-terminal servant aux interactions lipide-protéine ou protéine-protéine (Bellacosa *et al.* 1998) et en un domaine hydrophobe riche en proline en C-terminal (Figure 12). Pour comprendre le mode d'activation un peu particulier de Akt, il est important d'en connaître la structure

A. Domaine PH

Le domaine « pleckstrin homology » (PH) N-terminal, constitué d'une centaine d'acides aminés, fut caractérisé la première fois dans la pleckstrine (substrat phosphorylé par la PKC dans les plaquettes (Tyers *et al.* 1989). Ce domaine est retrouvé dans la majorité des molécules de signalisation régulées par les 3-phosphoinositides (Ferguson *et al.* 2000; Lietzke *et al.* 2000). Des études biochimiques ont montré que le domaine PH fixe les phosphatidylinositol 3, 4 bisphosphate (PIP2) et phosphatidylinositol 3, 4, 5 trisphosphate (PIP3) avec la même affinité (James *et al.* 1996 ; Frech *et al.* 1997). Ce domaine a pu être cristallisé (Thomas *et al.* 2002) et sert de modèles pour élaborer des inhibiteurs de Akt (Castillo *et al.* 2004) (Figure 13).

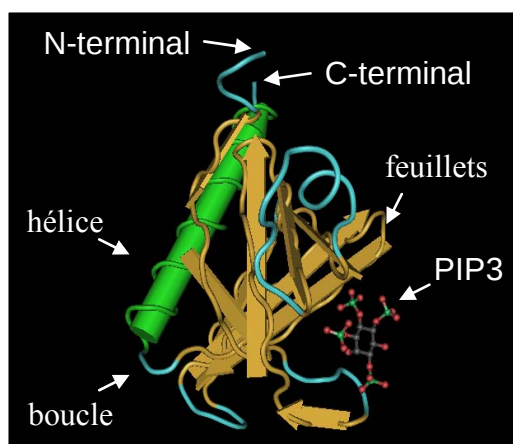


Figure 13. Cristallographie du PH domain de Akt1 interagissant avec un PIP3 (PIP3, phosphatidylinositol 3-phosphate, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi>)

B. Domaine catalytique

Le domaine catalytique de Akt présente une forte similarité avec les autres AGC kinases (PKA, PKC, p70S6K, p90RSK) (Peterson et Schreiber 1999). Il contient en particulier une thréonine (308 pour Akt1) nécessaire, par sa phosphorylation, à l'activation de Akt (Alessi *et al.* 1996).

C. Domaine hydrophobe

Le domaine hydrophobe C-terminal aussi appelé domaine régulateur de Akt contient une quarantaine d'acides aminés. Il porte le motif hydrophobe F-X-X-F/Y-S/T-Y/F caractéristique de la superfamille des AGC kinases (Thomas *et al.* 2002). Pour toutes les kinases de cette superfamille, la phosphorylation d'une sérine ou d'une thréonine dans ce motif hydrophobe est nécessaire à l'activation totale de la kinase. Chez les mammifères le motif hydrophobe est toujours FPQFSY et sa délétion abolit complètement l'activité de la kinase (Andjelkovic *et al.* 1997). Pourtant les variants d'épissage de Akt3 murin et de Akt1 humain ne possèdent pas ce motif suggérant qu'ils sont activés par d'autres mécanismes que la phosphorylation (Konishi *et al.* 1995; Brodbeck *et al.* 2001).

IV. EXPRESSION DE AKT

Des expériences de RT-PCR « en temps réel ont permis de déterminer la distribution tissulaire de Akt (Yang *et al.* 2003) (Figure 14). Chez l'individu sain, Akt1 et Akt2 sont constitutivement exprimés dans tous les types cellulaires. On note toutefois un plus haut niveau d'expression de Akt2 dans les tissus insulino-dépendants tels que les cellules adipeuses, le foie et les muscles. Akt3 est une forme de Akt qu'on retrouve à un très faible niveau d'expression dans les tissus à l'exception du poumon, du cerveau et des testicules dans lesquels Akt3 est fortement exprimé.

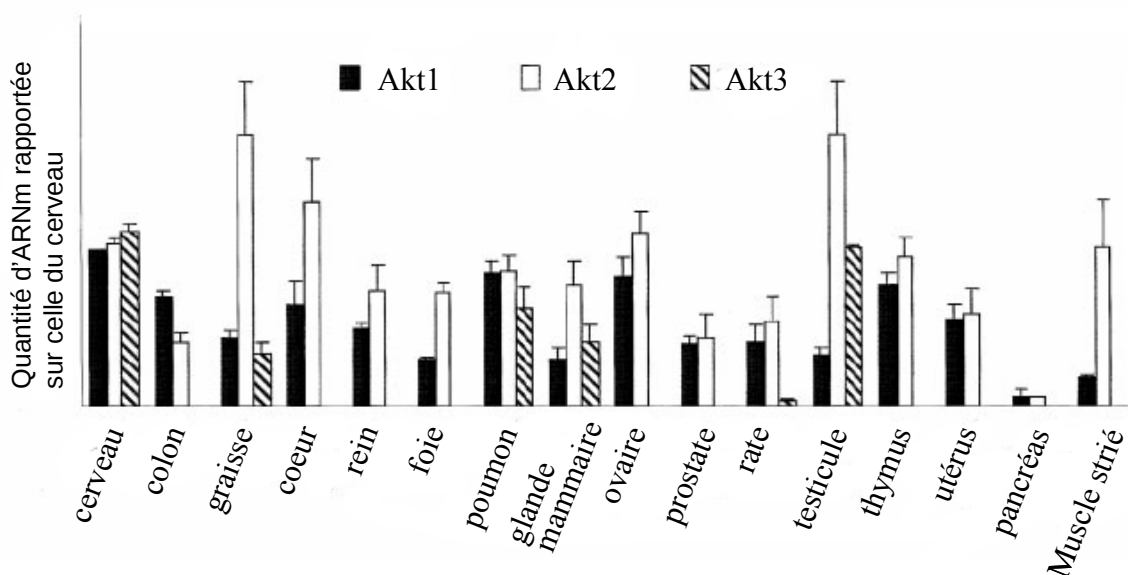


Figure 14. Distribution des ARNm des trois isoformes de Akt dans les différents tissus murins (D'après Yang et al. J.Biol.Chem. 2003)

V. ACTIVATION DE AKT

Initialement, Akt était étudiée pour son implication dans la signalisation des facteurs de croissance tels que le PDGF ou l'EGF (Burgering et Coffe 1995 ; Franke *et al.* 1995). Il a été montré que plus de 20 stimuli sont capables de stimuler l'activité de Akt de plus de 40 fois. Ils sont recensés dans le Tableau 2 et impliquent d'abord une activation de la PI3K. La stimulation de Akt par la majorité des signaux de stress amène à considérer Akt comme une voie de secours pour la cellule confrontée à de mauvaises conditions.

stimuli régulant les activités tyrosine kinase

angiopoietine-1
anticorps anti-CD28
epidermal growth factor
basic fibroblast growth factor
fibronectine
Gas6
anticorps anti-intégrine
interleukine 2
interleukine 3
interleukine 4
interleukine 5
interleukine 8
insuline
insulin-like growth factor 1 et 2
anticorps anti-killer cell inhibitory receptor
leukemia inhibitory factor
stem cell factor
vascular endothelial growth factor

stimuli régulant les récepteurs couplés aux protéines G

C5a
carbachol

fMet-Leu-Pro
opioïdes
platelet activating factor
RANTES

agonistes cAMP/PKA

CPT-cAMP
forskoline
8-Br-cAMP
isoproteronol

inhibiteurs de phosphatases

vanadate
peroxyvanadate
acide okadaïque

Autres activateurs

hypoxie
H₂O₂
choc thermique
anticorps anti-Fas
tumor necrosis factor- α
oestrogènes

Tableau 2: Enumération non-exhaustive des stimuli activateurs de Akt

A. Relocalisation membranaire

Akt est activé par les classes 1A et 1B de PI3K qui sont respectivement activés par les récepteurs à activité tyrosine kinase (Figure 15) et les récepteurs couplés aux petites protéines G (Wymann *et al.* 2003). Les phosphoinositides, générés par la PI3K, régulent Akt par une interaction directe avec le domaine PH de Akt (Franke *et al.* 1995 ; James *et al.* 1996 ; Franke *et al.* 1997 ; Frech *et al.* 1997 ; Klippel *et al.* 1997 ; Bellacosa *et al.* 1998 ; Sable *et al.* 1998).

La conséquence de cette interaction des PIP3 avec le domaine PH de Akt est une relocalisation de Akt du cytoplasme vers la face interne de la membrane plasmique où se situent les PIP3 générés par la PI3K (Andjelkovic *et al.* 1997 ; Meier *et al.* 1997 ; Wijkander *et al.* 1997 ; Zhang et Vik 1997 ; Sable *et al.* 1998). Akt peut être rendu constitutivement actif en remplaçant le domaine PH par un site de myristoylation (Burgering et Coffe 1995 ; Kohn *et al.* 1996). En fait, cette relocalisation de Akt permet l'interaction avec ses régulateurs qui la phosphorylent et l'activent. La phosphorylation de Akt est nécessaire à son activation (Bellacosa *et al.* 1991 ; Coffe et Woodgett 1991 ; Burgering et Coffe 1995 ; Andjelkovic, Jakubowicz *et al.* 1996 ; Kohn *et al.* 1996 ; Soskic *et al.* 1999). Alessi et collaborateurs ont trouvé 4 sites phosphorylés *in vivo* sur Akt : S124, T308, T450, S473. Les T308 et S473 sont phosphorylés en réponse aux stimuli alors que les S124 et T450 sont constitutivement phosphorylés. Seules les phosphorylations des T308 et S473 modifient donc l'activité de Akt.

B. Phosphorylation de la thréonine 308

Les enzymes sont capables de phosphoryler la T308 nécessitent aussi des PIP3 pour être activées, on les appelle les « 3-phosphoinositide-dependent kinases » (PDK). PDK1 a été cloné par séquençage peptidique des fractions capables de phosphoryler Akt (Alessi, James *et al.* 1997). Elle comprend un domaine PH et un domaine kinase proche de Akt. PDK1 phosphoryle donc Akt sur la T308 et la T473 et sa surexpression est suffisante pour activer Akt (Alessi *et al.* 1997). Contrairement à Akt, PDK1 est toujours actif (Alessi *et al.* 1997). PDK1 est localisé à la fois dans le cytoplasme et à la surface interne de la membrane plasmique (Currie, Walker *et al.* 1999). PDK1 dans un contexte *in vitro* ne peut pas phosphoryler Akt seul (Alessi *et al.* 1997 ; Stokoe, Stephens *et al.* 1997) mais nécessite de former un complexe avec la protéine kinase 2 (PRK2) (Balendran, Casamayor *et al.* 1999). C'est l'activité de ce complexe qui est régulée par les facteurs de croissance. Un deuxième niveau de régulation de Akt repose donc sur la régulation de l'activité de ce complexe PDK1/PRK2.

C. Phosphorylation de la sérine 473

L'identité de la kinase phosphorylant la sérine 473 est plus problématique. Elle a arbitrairement été nommée PDK2 en référence à PDK1 mais plusieurs kinases pourraient remplir cette fonction : la MAPKAP kinase-2, des isoformes de PKC, les « integrin-linked kinase » (ILK), la « DNA dependent protein kinase », ATM ou même PDK1 elle-même

(Bayascas et Alessi 2005). Une étude très récente montre que le RNAi d'une nouvelle forme de mTOR, insensible à la rapamycine, ou de son partenaire Rictor abolit totalement la phosphorylation de la sérine 473 (Sarbasov *et al.* 2005). Ces données suggèrent fortement que PDK2 serait en fait cette nouvelle forme de mTOR. Quelques groupes soutiennent l'hypothèse d'une auto-phosphorylation de Akt. Cependant aucune donnée ne montre pour l'instant que l'activation de Akt sur la sérine 473 soit dépendante d'une auto-phosphorylation dans des conditions normales (Hanada *et al.* 2004).

D. Le domaine PH activateur/inhibiteur

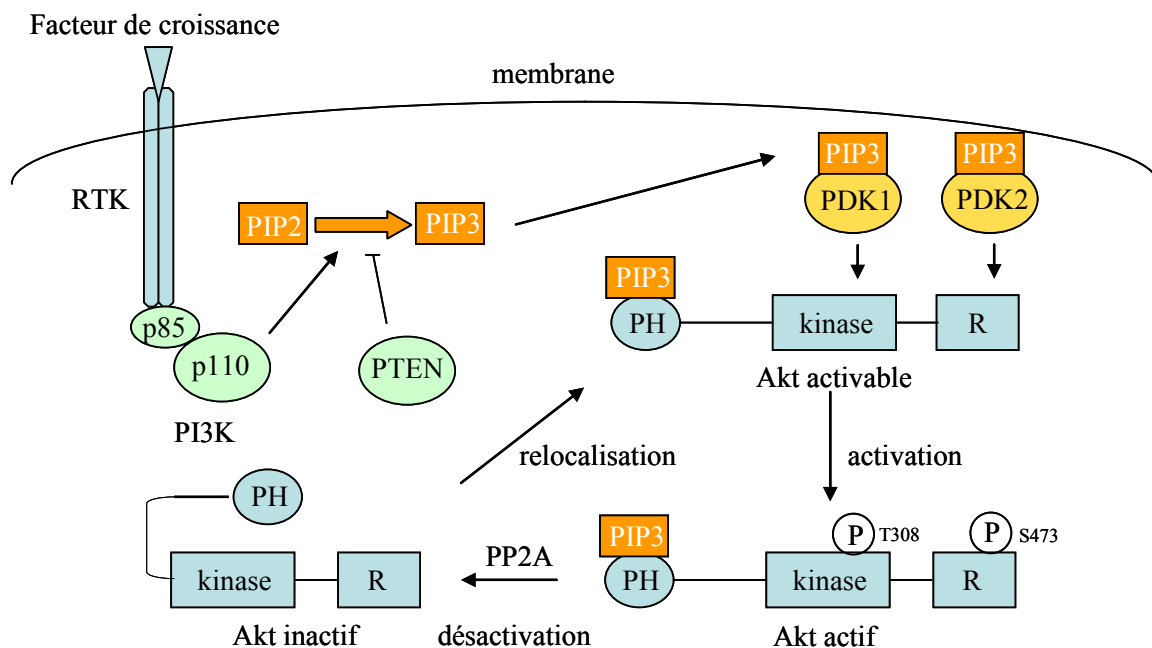


Figure 15. Schéma du mode d'activation de Akt. Le domaine PH de Akt et de ses activateurs sont capables de fixer les PIP3 générés par la PI3K et situés dans la membrane plasmique de façon à se colocaliser. Cette interaction PH/PIP3 localise Akt à la membrane, change la conformation de Akt et la rend activable. Une fois phosphorylé, Akt peut se détacher de la membrane pour aller phosphoryler d'autres substrats (PDK, phosphatidylinositol-dependent kinase ; PH, pleckstrin homology domain ; PI3K, phosphatidylinositol 3-kinase ; PIP2/3, phosphatidylinositol di/tri phosphate ; PP2A, protein phosphatase 2A ; PTEN, phosphatase and tensin homolog ; RTK, récepteur à activité tyrosine kinase).

Les PIP3, par leur fixation sur le domaine PH, modifient la conformation de Akt pour rendre ses sites de phosphorylation accessibles. Le domaine PH est nécessaire à ces phosphorylations (Alessi *et al.* 1997; Stokoe *et al.* 1997; Bellacosa *et al.* 1998; Currie *et al.* 1999). En effet, des mutations dans le PH domaine de Akt, qui abolissent la fixation aux PIP3, rendent PDK1 inefficace et des mutations, qui augmentent la fixation de lipides, diminuent la quantité de PIP3 nécessaires pour la phosphorylation de Akt par PDK1. Puisque PDK1 phosphoryle efficacement Akt lorsque son domaine PH est amputé, ce PH domaine aurait un rôle ambivalent activateur/inhibiteur de la phosphorylation de Akt. L'hypothèse avancée est

que le PH domaine masque ces sites de phosphorylation et que le changement de conformation induit par la fixation de PIP3 les rend accessibles pour les kinases activatrices.

E. Activations atypiques

Certains signaux de survie stimulent l'activité d'Akt par des mécanismes indépendants de la PI3K. C'est le cas des agonistes de la voie PKA (Sable *et al.* 1997 ; Filippa *et al.* 1999) ou de l'augmentation du taux de calcium. Le complexe calcium/calmoduline active la calcium/calmodulin dependent kinase kinase (CaMKK) qui phosphoryle directement Akt sur la Thréonine 308 (Yano *et al.* 1998). Les auteurs ont supposé que dans certaines situations CaMKK pourrait se substituer à PDK1 pour l'activation de Akt.

F. Inactivation de Akt

Peu de données sont connues concernant l'inactivation de Akt. L'utilisation d'un inhibiteur, l'acide okadaïque, a montré que la protéine phosphatase 2A (PP2A) inactive Akt par déphosphorylation de la thréonine 308. Cependant, les auteurs ont observé que l'inhibition de PP2A est quasiment sans effet sur la phosphorylation de la sérine 473 de Akt. La recherche d'une phosphatase insensible à l'acide okadaïque et possédant un domaine PH lui permettant de se colocaliser avec Akt a permis d'identifier la « protein phosphatase, PH domain leucine-rich repeat protein phosphatase » (PHLPP). Cette protéine est la seule phosphatase du génome humain à posséder un domaine PH. Elle déphosphoryle très efficacement la sérine 473 de Akt et n'a que peu d'effet sur la phosphorylation de sa thréonine 308 (Gao *et al.* 2005).

VI. PHILOGENIE DE LA PROTEINE AKT

L'alignement au niveau protéique des isoformes de Akt et de ses orthologues dans les différentes espèces montrent que cette structure est conservée au cours de l'évolution sauf la partie C-terminale, riche en prolines, qui est parfois absente chez certaines espèces ou isoformes (Datta *et al.* 1999) (Figure 16). La thréonine 308 (ou l'équivalent) est conservé dans tous les Akt connus. De même, la sérine 473 (ou l'équivalent) est conservée sauf dans l'Akt2 de *C. elegans*.

A l'échelle de la signalisation cellulaire, la voie PI3K/Akt est conservée dans la plupart des espèces étudiées. Comme chez l'humain elle régule la prolifération et la résistance à l'apoptose des cellules, toutefois une même régulation cellulaire se traduit différemment au niveau de l'organisme selon l'espèce concernée (Figure 17)

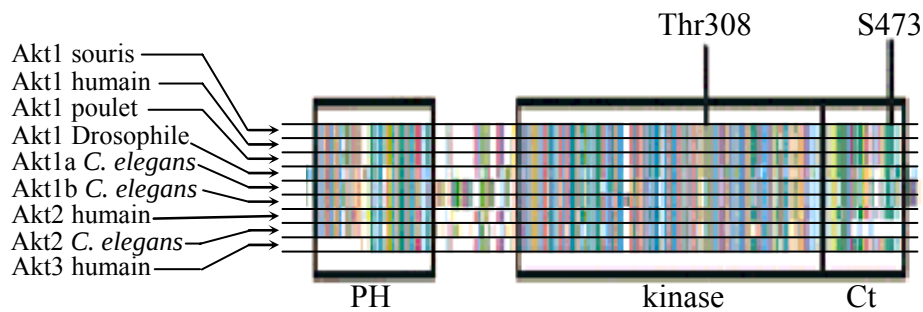


Figure 16. Alignements multiples de séquences peptidiques et de domaines de structure des isoformes de Akt. Les traits de couleur verticaux représentent une similarité en acides aminés. Leur absence indique des délétions ou des séquences dégénérées (Ct, C-terminal ; PH, pleckstrin homology domain). Tirée de Datta et al., Gen. Dev. 1999

A. *Saccharomyces cerevisiae*

Bien qu'aucune PI3K de classe 1 (famille de PI3K activant Akt chez l'humain) n'ait été retrouvée chez la levure, quelques indices montrent une bonne conservation de la voie. Par exemple, des levures diploïdes doublement délétées dans Tep1 (orthologue de PTEN (phosphatase and tensin homologue) et régulateur négatif de l'activation de Akt) ont une résistance accrue à la wortmannine (inhibiteur de la PI3K) et présentent une malformation de leur paroi (Heymont *et al.* 2000). D'autres orthologues de la voie ont été décrits tels que Pkh 1 et 2 (orthologues de PDK1 et PDK2), deux protéines TOR et surtout Shc9 orthologue de Akt qui accroît la durée de vie et la résistance au stress de la levure (Fabrizio *et al.* 2001).

B. *Caenorhabditis elegans*

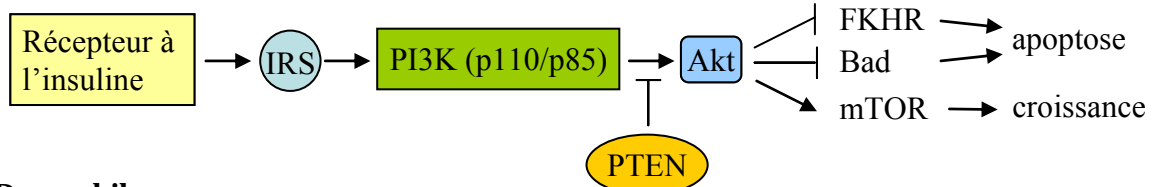
Chez *C. elegans*, Age1 (orthologue de la PI3K) régule la durée de vie et la diapause (stade larvaire induit par des conditions défavorables) (Morris *et al.* 1996). Daf2 (orthologue du récepteur à l'insuline) active, via Age1, Akt 1 et 2 dans un processus nécessitant un PDK1 fonctionnel (Kimura *et al.* 1997 ; Paradis *et al.* 1999). Des cibles de la voie PI3K/Akt sont également retrouvées avec Daf16 (orthologue de FKHR) (Lin *et al.* 2001) ainsi que des régulateurs tels que Daf18 (orthologue de PTEN) (Mihaylova *et al.* 1999).

C. *Drosophila melanogaster*

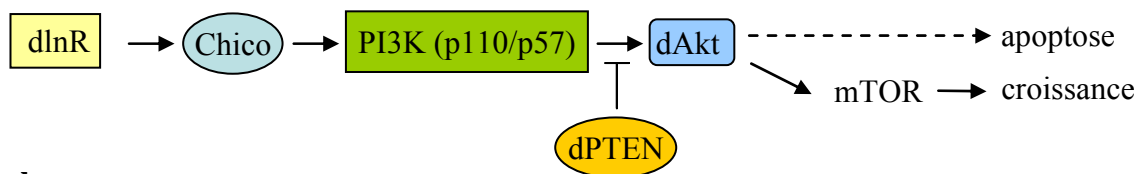
Chez *Drosophila*, il existe des orthologues pour tous les membres de la voie PI3K/Akt caractérisés chez l'humain que ce soit des IGFs stimulateurs aux effecteurs en aval (Montagne *et al.* 1999; Verdu *et al.* 1999; Zhang *et al.* 2000; Miron *et al.* 2001). Cette voie de signalisation régule la croissance cellulaire (Verdu *et al.* 1999 ; Zhang *et al.* 2000; Miron *et*

al. 2001) et la prolifération (Goberdhan *et al.* 1999). Des pertes de fonction dans la voie se traduisent pour la Drosophile par une incapacité à voler et une atrophie du corps dues à une réduction du nombre et de la taille des cellules. A l'opposé une perte de PTEN cause une augmentation de la taille et du nombre des cellules (Goberdhan *et al.* 1999).

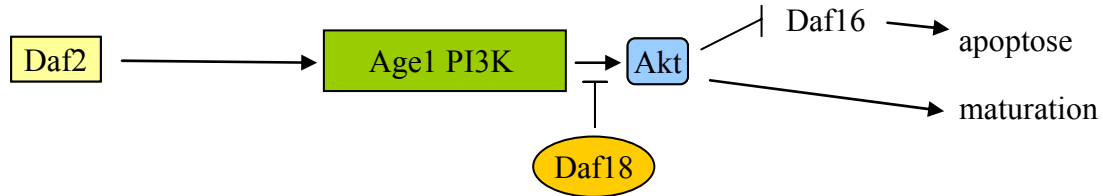
Humain



Drosophile



C. elegans



Levure

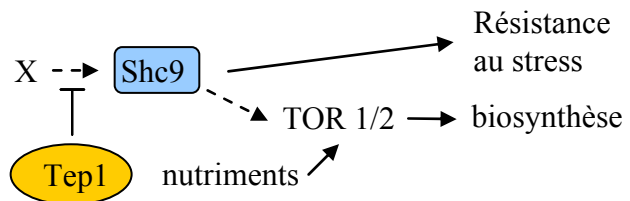


Figure 17. Conservation phlogénétique de la voie PI3K/Akt. Cette figure montre les orthologues des effecteurs de la voie PI3K/Akt ou leur absence dans 4 espèces étudiées ainsi que les effets biologiques qu'ils régulent (Daf, Dauer formation 2 ; dAkt, drosophila Akt ; dInR, drosophila insulin receptor ; FKHR, forkhead ; IRS, insulin receptor substrate ; mTOR, mammalian target of rapamycin ; PI3K, phosphatidylinositol 3-kinase ; PTEN, phosphatase and homolog of tensin ; Shc, src homologous and collagen).

VII. IDENTIFICATION DES SUBSTRATS DE AKT

Comme pour toute drogue ciblant une voie de signalisation impliquée dans de nombreux phénomènes cellulaires et physiologiques, les tests préliminaires des inhibiteurs de la voie PI3K/Akt ont montré une toxicité et des effets secondaires. Ceci a rendu nécessaire la connaissance des cibles de Akt pour comprendre ces effets secondaires et peut-être les diminuer ou évaluer le potentiel de réponse de futurs malades. C'est pourquoi, nombre d'études ont essayé d'identifier de nouveaux substrats de Akt afin d'en comprendre tous les mécanismes d'action. L'activation de Akt dans les cellules stimulées est rapide (quelques minutes). Une fois activé, Akt peut se dissocier de la membrane pour entrer éventuellement

dans le noyau rendant multiples ses cibles potentielles à la fois dans le cytoplasme et le noyau. Un challenge de ces dernières années est d'identifier les cibles de Akt et d'évaluer l'effet de la phosphorylation de ses substrats sur leur fonction.

nom de la cible	abréviation	effet sur la protéine	effet biologique
Bad	Bad	rétenion par 14-3-3 dans le cytoplasme	supression de l'effet pro-apoptotique de Bad
cyclic AMP response element binding protein	CREB	pouvoir transactivateur accru	augmentation de la transcription des gènes régulés par CREB
famille forkhead	FKHR	rétenion par 14-3-3 qui bloque sa translocation	inhibition des gènes pro-apoptotiques régulés par FKHR
inhibitor kappaB kinase	IKK	activation de l'activité catalytique	induction des gènes de survie régulés par NF-kB
procaspase-9	procaspase-9	diminution de l'activité cystéine protéase	supression de l'apoptose caspase 9 dependante
apoptosis signal-regulating kinase 1	Ask1	activation de l'activité enzymatique	activation des kinases de stress
murine double minute 2	Mdm2	translocation nucléaire	inhibition des processus régulés par p53
Glycogen synthase kinase 3	GSK3	inhibition de l'activité catalytique	diminution du métabolisme et de la prolifération cellulaire
p21cip/waf1	p21cip/waf1	exclusion nucléaire	levée de l'effet anti-prolifératif de p21
p27kip	p27kip	exclusion nucléaire	levée de l'effet anti-prolifératif de p27
tuberous sclerosis	TSC2	dissociation de TSC1	augmentation de la traduction et progression dans le cycle cellulaire
Télomérase humaine	hTERT	activation de l'activité enzymatique	diminution de la sénescence
Endothelial Nitrogen synthase	eNOS	activation de l'activité enzymatique	angiogenèse

Tableau 3. Substrats majeurs de Akt identifiés jusqu'à présent

Comme une part non négligeable de ce travail de thèse avait pour but l'identification de nouveaux substrats de Akt. Je décrirai ici les différentes approches originales qui ont précédemment permis la découverte de substrats de Akt.

A. Identification par consensus

Des études *in vitro* sur des banques de petits peptides de synthèse ont montré l'existence d'un consensus dans les peptides phosphorylés. Le site consensus optimal pour une phosphorylation par Akt est : RXaaRYaaZaaS/THaa ou Xaa est un acide aminé quelconque, Yaa ou Zaa de petits résidus autres que la glycine et Haa un acide aminé hydrophobe (Phe ou Leu) (Alessi *et al.* 1996). Une étude sur une banque de peptides plus ciblée sur ce consensus (Obata *et al.* 2000) a montré que les résidus environnant le consensus influencent sensiblement la phosphorylation des peptides par Akt. Le consensus est alors devenu moins stricte : RXaaRXaaXaaS/T. Cette étude a également permis l'élaboration d'un

algorithme de score pour rechercher ce consensus dans les génomes de vertébrés avec une stringence maximale quand on la retrouve dans moins de 0,2% des sites potentiels de phosphorylation par Akt et faible quand on la retrouve dans 1 à 5% (Yaffe *et al.* 2001). Le programme est disponible sur <http://scansite.mit.edu/motifscanner/motifscan1.phtml>. Il est à noter que certaines protéines sont maintenant des substrats reconnus de Akt *in vivo* et ne ressortent pourtant qu'avec des paramètres de stringence faible; ce qui montre une limite à l'approche bioinformatique sur des peptides de synthèse et non dans un contexte biologique.

Quasiment tous les substrats de Akt démontrés à ce jour présentent le consensus RXaaRXaaXaaS/T. Toutefois, dans un contexte *in vivo*, il s'avère que l'arginine en position -5 de la phosphorylation par Akt ne soit pas absolument indispensable puisque Insulin-response Element-binding Protein 1(KERCQS**1036**) (Villafuerte *et al.* 2004), Yes-Associated Protein (Basu *et al.* 2003), CREB LSRRPS**133**Y (Du et Montminy 1998), et ATP-citrate Lyase (TPAPSRTAS**F**) (Berwick *et al.* 2002) sont phosphorylés *in vivo* par Akt sans posséder cette Arginine en -5. Toutefois la recherche *in silico* a été le premier indice qui a permis d'identifier comme substrat de Akt le récepteur orphelin nur77 (Pekarsky *et al.* 2001) ou encore le facteur de transcription tal1 (Palamarchuk *et al.* 2005).

B. Utilisation d'anticorps

Le consensus RXaaRXaaXaaS/T a servi à élaborer des anticorps comme le PAS (phospho-Akt substrate) antibody pouvant reconnaître des substrats de Akt quand ils sont phosphorylés. C'est celui que nous avons utilisé dans notre étude. L'anticorps PAS a été utilisé aussi bien en Western-blot pour confirmer une phosphorylation sur un consensus de Akt, qu'en immunohistochimie pour refléter l'activité de Akt dans les tissus (Lynch et Daly 2002). Notons au passage que l'anticorps PAS est capable de reconnaître la Ser/Thr phosphorylée par Akt sans l'Arg en position -5 (Berwick *et al.* 2002), ce qui montre son utilisation possibles pour reconnaître des consensus non strictes. Certaines études ont utilisé l'anticorps PAS pour immunoprécipiter des substrats de Akt et les identifier par spectrométrie de masse. Cette approche n'a pas forcément identifié des substrats de Akt mais montrait que des sites répondant au consensus de Akt sont phosphorylés au cours de son activation et que l'emploi d'inhibiteur de cette voie de signalisation diminue cette phosphorylation comme pour AS160 (Akt substrate 160 kDa) (Kane *et al.* 2002).

C. Recherche de phosphorylation par utilisation de précurseurs radioactifs

Actuellement, 3 substrats sont utilisés pour tester l'activité de Akt dans les systèmes biologiques : l'histone H2B, la protéine basique de la myéline (MBP) et le crosstide, un peptide découlant de la banque criblée pour trouver le consensus. Sur l'histone H2B et la protéine basique de la myéline, le site de phosphorylation a été trouvé par phosphorylation *in vitro* par Akt en présence d' ATP γ ³²P. La séparation des peptides de digestion tryptique sur chromatographie hydrophobe (C18) et le séquençage individuel par réaction d'Edmann ont permis de localiser leurs sites de phosphorylation. Le pic radioactif correspond au site de phosphorylation par Akt soit RSRKESS36Y pour l'histone H2B et RXRXXSHyd (Hyd=Y dans la protéine basique de la myéline et Phe dans le Crosstide). La même approche a été utilisée pour retrouver des sites de phosphorylation sur des substrats putatifs de Akt après phosphorylation *in vitro*. L'incorporation de phosphate γ P32 aussi permet de mesurer le différentiel de phosphorylation d'une protéine dans des cellules transfectées par une forme constitutivement active ou un dominant négatif de Akt. Cette démarche a permis d'identifier l' « Apoptosis signal-regulating kinase 1 » (ASK1) comme cible de Akt (Kim *et al.* 2001).

D. GST-pulldown

L'interaction de Akt avec une protéine peut être démontrée en fusionnant cette protéine avec la glutathion S-transférase et en réalisant une chromatographie d'affinité sur glutathion. C'est ainsi qu'a été retrouvé Akt en interaction avec la protéine p47, composant de la NADPH oxydase (Chen *et al.* 2003).

E. Approche indirecte

La protéine 14-3-3 est une chaperone qui se fixe à des sites phosphorylés dont la séquence chevauche souvent partiellement les sites de phosphorylation par Akt. Basu et collaborateurs ont eu l'idée de rechercher grâce à une colonne d'affinité anti-14-3-3, les partenaires de 14-3-3 qui étaient régulés de façon dépendante de l'activation de Akt. Cette équipe a montré ainsi que YAP1 est une cible de Akt (Basu *et al.* 2003).

F. Méthode « kinase substrate tracking and elucidation » (KESTREL)

Dans cette méthode, les extraits protéiques de cellules non stimulées sont séparés en un maximum de fraction de chromatographie. Chaque fraction de chromatographie est mise

en contact avec un Akt actif ou non dans un tampon d'activité contenant de l'ATP γ marqué par ^{32}P . Chaque fraction est ensuite séparée par SDS-PAGE et les protéines phosphorylées par Akt sont révélées par autoradiographie. Leur identification se fait alors par empreinte tryptique. Cette méthode a permis l'identification de substrat de Akt nommés « calcium-regulated heat stable protein of 24 kDa » (CRHSP24) (Auld *et al.* 2005) et la méthylase des tRNA METTL1 (Cartlidge *et al.* 2005).

VIII. EFFECTEURS DE AKT

Dans le tableau 3 sont récapitulées les cibles de Akt les plus étudiées et l'effet de leur phosphorylation par Akt. L'éventail des processus cellulaires touchés confère à Akt une place centrale dans la régulation de la physiologie cellulaire. Je détaillerai les données sur les principaux substrats de Akt dans les parties intitulées « Akt et cycle cellulaire » et « Akt et survie cellulaire »

A. Contrôle de la survie cellulaire par Akt

Comme la PI3K permettait souvent la stimulation de la survie cellulaire par les facteurs de croissance et que Akt est une cible, des expériences ont été entreprises pour connaître l'implication de Akt dans le signal de survie des facteurs de croissance. La première expérience a été la transfection dans des cellules de corps granuleux d'un dominant négatif de Akt qui empêche leur sauvegarde par l'IGF-I et la transfection de Akt constitutivement actif qui mime l'action de sauvegarde de l'IGF-I (Dudek *et al.* 1997). Cette expression d'un mutant de Akt constitutivement actif désensibilise de nombreux types cellulaires à de nombreux stress apoptogènes tels que : sevrage en facteurs de croissance, irradiation aux UV, impossibilité d'ancrage des cellules, dégradation de l'ADN, ajout de l'agoniste de Fas ou du TGF β ou perturbation du cycle cellulaire (Dudek *et al.* 1997 ; Kauffmann-Zeh *et al.* 1997 ; Kennedy *et al.* 1997 ; Khwaja *et al.* 1997 ; Kulik *et al.* 1997 ; Philpott *et al.* 1997 ; Songyang *et al.* 1997 ; Xiong et Parsons 1997 ; Chen *et al.* 1998 ; Crowder et Freeman 1998 ; Eves *et al.* 1998 ; Gerber *et al.* 1998 ; Hausler *et al.* 1998 ; Kulik et Weber 1998 ; Rohn *et al.* 1998 ; Blair *et al.* 1999). Les facteurs de croissance voient également leur effet de survie bloqué par un dominant négatif de Akt que ce soit un mutant Akt sans activité catalytique (Dudek *et al.* 1997 ; Kennedy *et al.* 1997 ; Khwaja *et al.* 1997 ; Songyang *et al.* 1997 ; Berra *et al.* 1998 ; Chen *et al.* 1998 ; Crowder et Freeman 1998 ; Gerber *et al.* 1998 ; Kitamura *et al.* 1998 ; Kulik et Weber 1998 ; Yano *et al.* 1998) ou un mutant sans domaine PH (Songyang *et al.* 1997).

Deux dominants négatifs bloquent également l'activité de Akt et la stimulation de la survie cellulaire par les facteurs de croissance. (Rohn *et al.* 1998; Stambolic *et al.* 1998). Il s'agit d'une fusion d'un Akt sauvage avec la séquence d'adressage à la membrane de Ras CAAX (CAAX-Akt) et d'un mutant dans lequel les sites de phosphorylation par PDK1 sont mutés en alanine (AktTASA). Ces deux dominants négatifs sont fonctionnels mais leur mécanisme d'action n'est pas encore compris.

Des approches génétiques ont aussi démontré l'importance de Akt dans la survie cellulaire. En effet, la drosophile déficiente en dAKT1 montre une forte apoptose ectopique durant l'embryogenèse (Stavely 98). Akt est également dégradé dans les phases précoces de l'apoptose (Widmann *et al.* 1998). Ces données semblent indiquer que la diminution de l'activité Akt est un événement important dans l'initiation de la mort cellulaire programmée. Akt est définitivement l'un des plus importants médiateurs de la survie cellulaire. Comme nous allons le détailler maintenant, Akt peut agir directement sur les effecteurs ou les régulateurs de l'apoptose, indirectement sur leur transcription ou encore plus indirectement sur le métabolisme cellulaire.

1) Régulation directe des effecteurs de l'apoptose

Nous avons pu voir que de nombreuses données indiquent que l'une des fonctions majeures de Akt est de réguler l'effet de survie des facteurs de croissance et de bloquer l'apoptose. L'apoptose est un processus à plusieurs étapes comprenant une étape précoce de perte de l'intégrité des mitochondries suivie d'un relargage du cytochrome C. Ce cytochrome C se fixe à l'« apoptotic protease activating factor » (Apaf-1) pour l'activer. Il s'en suit l'activation de la cystéine protéase Caspase-9 qui initie la cascade des caspases effectrices de l'apoptose (Thornberry 1998). Les régulateurs de cette voie d'apoptose sont les membres de la famille Bcl-2. Cette famille contient des membres anti-apoptotiques tels que Bcl-2, Bcl-XL et des membres pro-apoptotiques tels que Bad, Bid, Bik (sous-famille BH3), Bax et Bak (sous-famille Bax) (Adams et Cory 1998).

Bad est un membre de la famille Bcl-2 qui se fixe à Bcl-2 ou Bcl-XL pour inhiber leur potentiel anti-apoptotique. Cependant, quand Bad est phosphorylé sur la sérine 136 par Akt, il ne peut plus exercer son action proapoptotique. C'est pourquoi on le considère comme l'une des cibles privilégiées de Akt dans son effet de survie (Datta *et al.* 1997; del Peso *et al.* 1997). Le potentiel apoptogène de Bad, après sa phosphorylation, est bloqué par sa complexation avec d'autres protéines. Une fois phosphorylé, Bad est relâché du complexe Bcl-2/Bcl-XL

localisé dans la membrane mitochondriale et se complexe avec les protéines 14-3-3 du cytosol qui le neutralise (Datta *et al.* 1999).

La caspase-9 est un initiateur et un effecteur de l'apoptose (Donepudi et Grutter 2002). La caspase-9 humaine est phosphorylée par Akt sur la sérine 196 et cette phosphorylation se traduit par l'atténuation de son activité cystéine-protéase (Cardone *et al.* 1998). Cependant, cette sérine 196 n'est pas conservée chez les mammifères inférieurs tels que le rat ou la souris suggérant que cette phosphorylation n'est pas un évènement physiologiquement majeur ou du moins qu'elle est spécifique des mammifères supérieurs (Fujita *et al.* 1999).

La voie des « Stress-activated protein kinases » (SAPK) régule la réponse des cellules au stress ou aux cytokines. Le système SAPK contient deux groupes de kinases : C-Jun N-terminal kinase (JNK) et p38 mitogen activated protein kinase (p38 MAPK) (Johnson et Lapadat 2002). Akt peut phosphoryler trois kinases en amont des SAPK. Apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1) est une MAPKKK phosphorylée par Akt sur la Sérine 83 ce qui l'empêche d'induire l'apoptose (Kim *et al.* 2001). La Mixed lineage kinase 3 (MLK3) est une autre MAPKKK phosphorylée par Akt sur la Sérine 674. Cette phosphorylation inactive MAPKKK et accroît la survie cellulaire (Barthwal *et al.* 2003). De la même façon, SEK1/MKKK4 est phosphorylé par Akt sur la Sérine 78 ce qui inactive SEK1 et inhibe l'apoptose induite par les UV (Park *et al.* 2002). Le fait que trois MAPKKK soient directement régulées négativement par Akt suggère que la voie SAPK est une cible importante pour Akt dans son blocage de l'apoptose.

2) Régulation de la survie cellulaire au niveau transcriptionnel

Akt est également capable de réguler l'expression de gènes pro ou antiapoptotiques en phosphorylant les facteurs de transcription qui régulent leur promoteur.

La famille de facteurs de transcription FoxO forkhead (FoxO ou FH) a été identifiée à partir de l'analyse de *C. elegans* (Paradis et Ruvkun 1998). Les 4 isoformes FKHR/ FoxO1, FoxO2, FKHRL1/FoxO3 et AFX/FoxO4 sont directement phosphorylés par Akt ce qui bloque leur activité transcriptionnelle sur des gènes pro-apoptotiques. Les facteurs de transcription forkhead régulent des éléments de réponse au ligand de mort : Fas-ligand, TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL), et TNF receptor type 1 associated death domain (TRADD). Ils régulent également des composants des voies de signalisation de l'apoptose : Bcl-2 interacting mediator of cell death (Bim) et Bcl-6 (Burgering et Medema 2003).

Nuclear factor kappaB (NFκB) est une famille de facteurs de transcription régulant la réponse immunitaire et la survie cellulaire. La dérégulation de l'activité de ces facteurs de

transcription participe à des maladies telles que l'auto-immunité et le cancer (Karin *et al.* 2004). Dans la plupart des cas, l'activation de NF κ B est dépendante de la phosphorylation du complexe « inhibitor kappaB kinase » (IKK) et de la dégradation de « inhibitor kappaB » (I κ B) (Karin *et al.* 2004). Akt régule l'activité de IKK α directement ou indirectement par phosphorylation (Kane *et al.* 1999), ce qui amène la translocation nucléaire du facteur de transcription NF κ B et donc la transcription NF κ B dépendante de gènes de survie incluant Bcl-Xl, des inhibiteurs des caspases (IAP pour inhibitor of apoptosis proteases) et c-Myb (Barkett et Gilmore 1999 ; Lauder *et al.* 2001).

Murine double minute 2 (Mdm2) est un oncogène induit par p53 (Shimizu et Hupp 2003). Le suppresseur de tumeur p53 est un régulateur majeur de la mort cellulaire en particulier après dommage de l'ADN (Oren 2003). Le niveau d'expression et la fonction de p53 sont fortement diminués par l'action de la E3 ubiquitin ligase Mdm2. Akt phosphoryle Mdm2 sur les sérines 166 et 186 ce qui relocalise Mdm2 dans le noyau (lieu d'action de p53) et augmente son activité ligase (Mayo et Donner 2001 ; Gottlieb, Leal *et al.* 2002). Le complexe Mdm-2/p53 est exporté dans le cytoplasme où p53 est dégradé par le système ubiquitine-proteasome (Sherr 2000). C'est ainsi que Akt régule le niveau d'expression et d'activité de p53 via la phosphorylation de Mdm2 et empêche l'apoptose et l'arrêt du cycle cellulaire dépendants de p53.

Cyclic AMP (cAMP)-response element binding protein (CREB) est un facteur de transcription phosphorylé par Akt sur la sérine 133. Cette phosphorylation augmente le potentiel transactivateur de CREB et son affinité pour son co-activateur CRB (Du et Montminy 1998). Certains effets transcriptionnel de Akt sur des gènes anti-apoptotiques comme Bcl-2 ou mcl-1 passent par une transactivation par CREB (Barthwal *et al.* 2003).

Yes associated protein (YAP) est un substrat de Akt qui a été identifié comme une protéine reconnue par 14-3-3. La phosphorylation de YAP sur la Sérine 127 lui confère un rôle d'inhibiteur de l'apoptose dépendante de p53 (Basu *et al.* 2003).

3) Régulation métabolique de la survie cellulaire

Une importante fonction de Akt est la régulation du métabolisme cellulaire. Lors d'une hyperinsulinémie, Akt inhibe, par phosphorylation, la glycogen synthase kinase 3 (GSK3) ce qui augmente le stockage du glucose en glycogène (Cross *et al.* 1995). GSK3 est aussi impliqué dans le contrôle d'autres voies de signalisation telles que la voie β -catenin/lymphoid enhancer factor-1 (LEF1)/T-cell factor (TCF) (Doble et Woodgett 2003). Bien que

les bases moléculaires ne soient pas encore comprises, l'inhibition de GSK3 protège les cellules de l'apoptose dans certaines circonstances (Pap et Cooper 1998). L'hypothèse avancée est que cet effet anti-apoptotique serait lié aux effets métaboliques de l'inhibition de GSK3. Le sevrage des cellules en facteurs de croissance se traduit par une diminution de leur capacité à utiliser les nutriments du milieu ce qui induit une déplétion en ATP et en métabolites dérivés du glucose (Rathmell *et al.* 2000). L'activation de Akt permet aux cellules de continuer à importer glucose et acides aminés (Vander Heiden *et al.* 2001; Edinger et Thompson 2002). La capacité de Akt à promouvoir l'utilisation du glucose prévient le changement de conformation de Bax nécessaire à son effet suite à des stimuli apoptogènes (Rathmell *et al.* 2003). Ces données sur Akt et le lien entre métabolisme et survie cellulaire sont pour l'instant fragmentaires mais on peut penser qu'elles seront très bientôt complétées.

B. Contrôle du cycle cellulaire par Akt

L'inhibition de la voie PI3K/Akt par des inhibiteurs pharmacologiques ou des dominants négatifs aboutit à l'arrêt du cycle cellulaire dans certains modèles (Vemuri et Rittenhouse 1994 ; Castoria *et al.* 2001). De nombreuses cibles de Akt régulent elles-mêmes la synthèse protéique, le métabolisme du glycogène ou encore la progression dans le cycle cellulaire et expliquent l'effet de akt sur la prolifération. Ce sont GSK-3, la phosphodiesterase 3B, mTOR, IRS-1, p21, p27.

La phosphorylation de GSK3 par Akt prévient la phosphorylation et la dégradation de la β -caténine et induit sa translocation nucléaire. Or la β -caténine s'associe dans le noyau avec des facteurs de transcription tels que TCF/LEF-1 pour induire l'expression de gènes favorisant la progression dans le cycle cellulaire comme celui de la cycline D1. La GSK3 phosphoryle aussi directement la cycline D1, diminuant ainsi sa stabilité. Comme la phosphorylation de GSK3 par Akt diminue son activité, il en résulte une stabilisation de la cycline D1 et une prolifération cellulaire accrue (Diehl *et al.* 1998).

La phosphodiesterase 3B (PDE3B) est un important régulateur des concentrations intracellulaires en messagers secondaires, principalement un régulateur du taux de l'AMPc. Il a été montré qu'en phosphorylant PDE3B sur la sérine 173, Akt régule positivement la concentration en AMPc dans les cellules et accélère la progression dans le cycle cellulaire (Kitamura *et al.* 1999; Ahmad *et al.* 2000).

Les protéines p21/waf1/kip1 et p27 sont des suppresseurs de tumeur ; elles se lient au complexe des « cyclin-dependent kinases » et inhibent la progression dans le cycle cellulaire.

Akt inhibe l'activité de p21 et p27 par une phosphorylation qui entraîne leur séquestration dans le cytoplasme (Zhou *et al.* 2001 ; Viglietto *et al.* 2002). De plus, l'activité de Akt diminue l'expression de p21 et de p27 via l'inhibition de FKHR (Dijkers *et al.* 2000 ; Graff *et al.* 2000; Medema *et al.* 2000). Akt module également l'activité de p21 en empêchant son interaction avec la « proliferating cell nuclear antigen » (PCNA), interaction nécessaire à son effet d'arrêt du cycle cellulaire (Lawlor et Rotwein 2000 ; Rossig *et al.* 2001).

Comme nous l'avons vu précédemment, la phosphorylation de mdm2 induit une dégradation et une perte du pouvoir transactivateur de p53. Comme en plus de ses effets sur la survie cellulaire, p53 peut également bloquer la progression du cycle cellulaire, il en résulte une prolifération accrue (Mayo et Donner 2002).

La phosphorylation de p70^{S6K} par PDK1 et l'activation, par phosphorylation, de mammalian target of rapamycin (mTOR) par Akt réalise une véritable intégration des deux voies de signalisation. Récemment, il a été montré que certains effets transformants de la voie PI3K/Akt sur la prolifération et la croissance cellulaires sont relayés principalement par la voie mTOR/p70^{S6K} : Tuberous sclerosis (TSC) est une maladie caractérisée par la formation de plaques sclérotiques dans de nombreux tissus. Les formes sporadiques et familiales de cette maladie sont la conséquence de la mutation des suppresseurs de tumeur TSC1 et TSC2 qui codent respectivement l'hamartine et la tubérine dont la fonction normale est assurée lors de leur interaction réciproque. La phosphorylation de TSC2 par Akt inhibe son interaction avec TSC1. Or, la fonction principale du complexe TSC1/2 est justement d'inhiber le puissant activateur de la traduction p70 ribosomal S6 kinase 1 via l'activation de mTOR. P70^{S6K} ne peut alors plus phosphoryler l'« eukariotic initiation factor 4E binding protein 1 » (4E-BP1), régulateur négatif de la traduction (Dan *et al.* 2002; Inoki *et al.* 2002 ; Manning *et al.* 2002 ; Potter *et al.* 2002 ; Tee *et al.* 2002).

IX. CONSEQUENCE DE LA PERTUBATION DE LA VOIE AKT

A. Modèles murins pour la voie PI3K/Akt

Nous avons vu que la voie PI3K/Akt est stimulée par un grand nombre de stimuli notamment les IGFs, facteurs de croissance pleiotropes capables de stimuler la quasi-totalité des cellules de l'organisme. La perturbation des éléments de la voie PI3K/Akt dans des modèles animaux provoque le plus souvent des malformations majeures au niveau des tissus

et de l'organisme. Le modèle animal le plus étudié étant celui de la souris, nous recenserons ici les anomalies observées dans les souris suite à la modification de la voie PI3K/Akt.

L'expression cardiaque d'une p110 constitutivement active provoque une augmentation significative de la taille du cœur. Inversement, l'expression cardiaque d'un dominant négatif de p110 provoque une diminution de la taille du cœur (Shioi *et al.* 2000). De même, l'expression cardiaque d'un Akt1 constitutivement actif augmente la taille du cœur (Shioi *et al.* 2002). L'expression dans les lymphocytes T d'une forme constitutivement active de p85 provoque des anomalies dans la maturation des lymphocytes T avec augmentation de l'effet mémoire, une résistance à l'apoptose et l'apparition de lymphomes pour des souris Trp53^{-/-} (Borlado *et al.* 2000). L'expression mammaire de cette même forme active de Akt provoque un retard de l'involution de la glande mammaire à la fin de la lactation (Hutchinson et Muller 2000). Les souris p85 α ^{-/-} souffrent d'hypersensibilité à l'insuline, d'hypoglycémie et d'immunodéficience (Fruman *et al.* 1999 ; Suzuki *et al.* 1999 ; Terauchi *et al.* 1999). Les souris KO pour p85 α , p50 α et p55 α (toutes les sous-unités régulatrices de la PI3K) meurent juste avant ou juste après la naissance (Fruman *et al.* 2000). Les souris KO pour p110 α (sous-unité catalytique de la PI3K) meurent au cours de l'embryogenèse (Bi *et al.* 1999). Les souris p110 χ ^{-/-} ont une déficience d'activation des lymphocytes T, de migration des neutrophiles et développent des cancers du colon (Hirsch *et al.* 2000 ; Li *et al.* 2000; Sasaki *et al.* 2000; Sasaki *et al.* 2000).

L'inactivation de Akt1 provoque un retard de croissance et une augmentation générale de l'apoptose (Cho *et al.* 2001) alors que la même inactivation de Akt2 provoque uniquement une diminution de la capacité à puiser le glucose sanguin (Cho *et al.* 2001). L'expression dans les cellules T d'une protéine de fusion gag-Akt provoque une résistance à l'apoptose des lymphocytes T et une suractivation de NF κ B (Jones *et al.* 2000). L'expression d'une forme constitutivement active de Akt (myristoylée) dans les cellules bêta des îlots de Langerhans provoquent une survie accrue des cellules beta, une hypertrophie, une hyperplasie et une hyperinsulinémie chez l'animal (Bernal-Mizrachi *et al.* 2001; Tuttle *et al.* 2001).

L'inactivation de PTEN provoque chez les homozygotes une mort des embryons et chez les hétérozygotes l'apparition de nombreux cancers (système uro-génital, cellules germinales, endomètre, thyroïde, prostate, sein, foie et intestin) (Di Cristofano *et al.* 1998; Suzuki *et al.* 1998 ; Podsypanina *et al.* 1999 ; Stambolic *et al.* 2000).

A la vue de ces données, notons que la suractivation de la voie PI3K/Akt implique le plus souvent l'apparition de cancers dans les souris transgéniques. Ces données *in vivo*

soulignent, une fois de plus, l'importance physiologique et le pouvoir oncogénique de cette voie de signalisation.

B. Altérations de la voie PI3K/Akt dans les cancers

Comme proposé par Hanahan et Weinberg, la plupart des changements génétiques et épigénétiques relatifs au phénotype cancéreux sont une succession de perturbations physiologiques qui, cumulées, induisent la malignité de la cellule. Comme le montre le Tableau 4, les voies de signalisation régulées par Akt jouent un rôle important dans ces perturbations. Cette voie joue non seulement un rôle important dans le développement tumoral mais également dans le potentiel de la tumeur à répondre aux traitements anti-cancéreux.

Perturbations physiologiques fonctions de Akt

Autonomie vis-à-vis des signaux de croissance	Une surexpression ou une suractivation de Akt hypersensibilise la cellule aux facteurs de croissance environnant
Insensibilité aux signaux inhibiteurs de croissance	Induit la translocation nucléaire de Mdm2 qui inhibe p53 Induit la séquestration cytoplasmique de p21 et p27, stabilise la cycline D1 favorisant le cycle cellulaire
Inhibition de l'apoptose	Inactive les proapoptotiques Bad, procaspase 9 Active IKK (NF-κB) Inactive Forkhead (activateur de l'expression de proapoptotiques : FasL...)
Potentiel de réplication illimité	Augmente l'activité de la télomérase hTERT
Angiogenèse	Augmente l'activité de eNOS
Invasion et métastase	Inhibe l'anoikis et stimule la sécrétion des MMPs

Tableau 4. Effecteurs de Akt et cancérogenèse. Ce tableau énumère les principales cibles de Akt en corrélation avec les paramètres du développement tumoral (eNOS, endothelial nitrogen synthase ; hTERT, human telomerase retro transcriptase ; IKK, inhibitor kappaB kinase ; mdm2, murine double minute 2 ; MMP, matricial metalloprotease ; NFκB, nuclear factor kappaB).

1) Altérations du gène de la PI3K

L'altération majeure observée dans les cancers est une amplification du gène PIK3C (3q26) de la sous-unité catalytique p110α PI3K. La région 3q26 est souvent amplifiée dans les cancers de l'ovaire (Shayesteh *et al.* 1999) ou de l'utérus (Ma *et al.* 2000).

2) Altérations du gène de Akt

Ni modifications ni mutations de la partie codante du gène Akt n'ont été retrouvées chez les mammifères. Ce sont plutôt des amplifications de Akt que l'on retrouve dans les

cancers humains. Le pouvoir oncogénique de l'amplification de Akt a été montré la première fois en détectant Akt1 dans des carcinomes gastriques. Il a été montré que la suractivation de Akt est transformante pour des fibroblastes NIH 3T3 (Sun *et al.* 2001). On retrouve des amplifications de Akt2 dans les cancers de l'ovaire, du pancréas, du sein et de l'estomac (Bellacosa *et al.* 1995; Cheng *et al.* 1996 ; Ruggeri *et al.* 1998). L'étude clinique à grande échelle de l'expression de la protéine Akt et son activation est actuellement en cours.

3) Autres altérations de la voie PI3K/Akt

L'activation ligand-dépendante de récepteurs à activité tyrosine kinase, de récepteurs couplés aux protéines G ou aux intégrines mène à une stimulation de la PI3K. Une telle activation peut survenir indépendamment du récepteur par exemple lors de la surexpression de Ras constitutivement actif (Kauffmann-Zeh *et al.* 1997; Rodriguez-Viciano *et al.* 1997). Dans les cancers, la surexpression des récepteurs de surface ou de formes constitutivement actives des récepteurs (Blume-Jensen et Hunter 2001) induit également une suractivation de leurs voies de signalisation. L'exemple le plus classique est celui du récepteur ErbB2/HER2/Neu, dont la surexpression suite à une amplification du gène observée dans le cancer du sein et de nombreux cancers (Harari et Yarden 2000), correspond à une suractivation des voies de signalisation des récepteurs ERB. Cette suractivation mène à une stimulation de la prolifération, l'invasion et la survie cellulaire. En fait, les tumeurs du sein surexprimant ErbB2 montrent souvent une activation constitutive de la voie PI3K/Akt (Zhou *et al.* 2000). Akt serait même un des effecteurs majeurs de la signalisation de ErbB2 pour ses effets sur la prolifération et la survie des cellules de cancer du sein (Nicholson *et al.* 2003).

D'autres éléments sont en fait des régulateurs négatifs de Akt. PTEN (phosphatase and tensin homologue) aussi appelé MMAC1 (mutated in many advanced cancers) est une phosphatase qui déphosphoryle protéines et lipides, essentiellement les PIP3 en 3', qui sont justement les phosphoinositides nécessaires à l'activation de Akt. Des études de surexpression de PTEN en cellules mammaires ont montré que PTEN peut être considéré comme un suppresseur de tumeur qui inhibe la croissance cellulaire, augmente la sensibilité cellulaire à l'apoptose et à l'anoikis (Weng *et al.* 1999). PTEN est fréquemment inactivé dans les étapes précoces de nombreux cancers tels que les glioblastomes et les cancers de la prostate et de l'endomètre. Des formes héréditaires de mutations de PTEN aboutissent au syndrome de Cowden associé à un risque élevé de cancer du sein et d'autres carcinomes (Simpson et Parsons 2001). La perte d'hétérozygotie d'allèles de PTEN mène une activation constitutive

de la voie PI3K/Akt et à une résistance de la tumeur aux traitements chimiques (Oki *et al.* 2005).

C. Akt et cancer du sein

On retrouve dans le cancer du sein un niveau élevé d'activité kinase de Akt1 (Sun *et al.* 2001), une amplification et une surexpression de Akt2 (Bellacosa *et al.* 1995), une amplification et une surexpression des « ribosomal protein S6 kinase » (Barlund *et al.* 2000; Barlund *et al.* 2000), une perte d'hétérozygotie du locus de PTEN (Teng *et al.* 1997) et une suractivation de la PI3K (Sun *et al.* 2001). PHLPP, la phosphatase déphosphorylant directement Akt est situé en 16q22 sur une zone chromosomique fréquemment mutée lors des cancers du sein mais aucune donnée statistique n'est encore disponible.

Des travaux sur le cancer du sein ont montré que la suractivation de la voie PI3K/Akt corrèle avec la résistance aux chimiothérapies ou aux radiations (Knuefermann *et al.* 2003). Il a été reporté une corrélation entre la surexpression de HER2/Neu et la suractivation de PI3K/Akt dans le cancer du sein et que Akt serait un médiateur important de la résistance à l'apoptose suite à la surexpression de HER2/Neu (Bacus *et al.* 2002). Cette suractivation de Akt suite à la surexpression de HER2/Neu équivaut à un mauvais pronostic pour le patient (Tokunaga *et al.* 2005). Ce rôle important de Akt serait dû en partie à la phosphorylation de Mdm2 par Akt (Zhou et Hung 2002). Pour son implication dans la résistance à de multiples traitements, la voie Akt a été logiquement proposée comme cible thérapeutique pouvant améliorer le pronostic pour les patientes atteintes de cancer du sein (Knuefermann *et al.* 2003).

X. CIBLAGE DE LA VOIE PI3K/AKT

A ce jour, la résistance tumorale aux traitements anti-néoplasiques est attribuée à une augmentation de l'expulsion des drogues hors de la cellule et à une augmentation des processus de détoxification. Malgré une bonne corrélation de ces mécanismes, à eux seuls, ils ne peuvent rendre compte totalement des phénomènes de résistance. Les suractivations des voies de signalisation anti-apoptotiques observées dans les tumeurs résistantes amènent logiquement à cibler ces voies pour éviter la résistance des tumeurs aux traitements (O'Gorman *et al.* 2001).

cibles cibles en amont	agents	société	classe	phase de test clinique
EGFR	IMC-C225 cetuximab	Erbitux; Imclone	anticorps	3
	ABX-EGF	Abgenix	anticorps	2
	EMD 72000	Merck	anticorps	1
	RH3	York medical bioscience Inc.	anticorps	2
	MDX-447	Medarex/Merck	anticorps	1
	ZD1839 gefitinib	Iressa/AstraZeneca	inhibiteur de kinase	3
	OSI-774 erlotinib	Tarceva	inhibiteur de kinase	3
	PKI116	Novartis	inhibiteur de kinase	2
	CI-1033/PD183805	Pfizer	inhibiteur de kinase	1
	EKB-569	Wyeth-Ayerst	inhibiteur de kinase	1
	GW2016/572016	GlaxoSmithKline	inhibiteur de kinase	1
HER-2/Neu	Trastuzumab (Herceptin)	Genentech	anticorps	enregistré
	MDX-210	Novartis	anticorps	1
	2C4	Genentech	anticorps	1
	17-AAG	Kosan	inhibiteur de HSP90	1
BCR-ABL/PDGFR/c-Kit	Imatinib/Gleevec	Novartis	inhibiteur de kinase	enregistré
PDK-1	UCN-01	Kyowa Hakko Kogyo	analogue de staurosporine	2
Ras	ISIS 2503	Isis Pharm.	oligonucléotide antisens	2
	R115777	Johnson and Johnson	inhibiteur de farnesyl transférase	3
	SH66336	Schering Plough	inhibiteur de farnesyl transférase	2
	BMS214662	Bristol Myers Squibb	inhibiteur de farnesyl transférase	1
ciblage direct				
PI3K	wortmannin		inhibiteur de PI3K	préclinique
	LY294002		inhibiteur de PI3K	préclinique
Akt	PX-316		D-3-Deoxy-phosphatidyl-myo-inositol	préclinique
	KP372-1		inhibiteur de Akt	
cibles en aval				
mTOR	CCI-779	Wyeth	bloque FKBP12	2
	RAD001	Novartis	bloque FKBP12	2
	rapamycin/sirolimus	Wyeth	bloque FKBP13	enregistré

Tableau 5. Inhibition de la voie PI3K/Akt. Devant l'importance croissante de la voie PI3K/Akt dans les pathologies humaines. De nombreuses entreprises ont mis au point des inhibiteurs. Tous ne sont pas encore testés en clinique mais on peut remarquer la variété des approches utilisées : anticorps, inhibiteurs de kinase, analogue de lipides (EGFR, epidermal growth factor receptor ; PDGFR platelet derived growth factor receptor ; PDK, phosphatidylinositol-dependent kinase ; PI3K, phosphatidylinositol 3-kinase ; mTOR, mammalian target of rapamycin).

Le cancer du sein n'est évidemment pas le seul cancer dans lequel Akt est important. De nombreuses études ont montré que l'activation de la voie PI3K/Akt induit une résistance à l'apoptose des modèles de cancers ou corrèle avec une résistance au traitement de la tumeur. Ce qui a amené les auteurs à proposer cette voie comme cible thérapeutique pour chacun de ces cancers. C'est le cas pour les cancers de l'ovaire (Page *et al.* 2000), du poumon (Brognard et Dennis 2002), du pancréas (Ng *et al.* 2000), de la vessie (Tanaka et Grossman 2003), du colon (Itoh *et al.* 2002). Dès lors de nombreux inhibiteurs de la voie PI3K/Akt, directs, en amont ou en aval ont été mis au point et sont à différents stades de test. Ils sont résumés dans le Tableau 5.

CHAPITRE 4: LA PROTEOMIQUE ET L'ETUDE DES VOIES DE SIGNALISATION

Après le séquençage du génome humain, nous entrons dans une phase qualifiée de post-génomique dans laquelle l'analyse des protéines (protéomique) occupe une place importante. La protéomique est ainsi de plus en plus utilisée dans tous les domaines de la biologie et en particulier dans le domaine biomédical (Hondermarck 2004). Le séquençage du génome humain a permis de dénombrer pas moins de 32 000 phases ouvertes de lecture (ORF, open reading frame) putatives. Les récentes études sur micropuces ont montré qu'au moins 12 000 de ces ORF sont exprimées au même moment dans un contexte cellulaire donné et 90 % différeraient selon le type tissulaire (Su *et al.* 2002; Shmueli *et al.* 2003).

Devant la complexité des mécanismes cellulaires, de nouvelles méthodes sont développées pour étudier des profils globaux dans des états cellulaires donnés. Les puces à ADN sont maintenant pratiquement capables de cribler l'ensemble des gènes pour certains organismes. Par contre, les puces à protéines ne sont pas encore capables de cribler l'ensemble des espèces protéiques à cause, en partie, de la complexité des espèces concernées. En effet, les modifications post transcriptionnelles de type épissage alternatif donnerait 3 fois plus de type d'ARNm que d'ORF (Harrison *et al.* 2002). De plus, le nombre des modifications post-traductionnelles différentes n'est pas encore connu mais multiplierait encore le nombre d'espèces protéiques par 4 à 10. Nous arrivons donc au million d'espèces protéiques différentes pouvant être retrouvées dans les tissus humains. Contrairement aux acides nucléiques, les protéines varient beaucoup en terme de propriété physico-chimiques notamment à cause des nombreuses modifications post-traductionnelles possibles et il est difficile de trouver une méthode permettant de toutes les étudier en même temps. Un niveau de complexité est encore ajouté quand nous étudions les voies de signalisation soutenant les mécanismes cellulaires car ces informations ne sont pas disponibles par un simple profilage des espèces protéiques d'un type cellulaire.

C'est pourquoi, la compréhension des voies de signalisation requiert des profilages différentiels, la caractérisation des protéines, leur quantification relative et l'étude des interactions protéine-protéine. Dans ce contexte, le développement de la spectrométrie de masse a permis l'évolution de ces approches différentielles globales. Durant la durée de cette thèse, de nouvelles approches de protéomique sont apparues. Au vu des nouvelles méthodes

de purification de complexes protéiques et des nouvelles méthodes de quantification isotopique, si notre projet devait être recommencé nous ne choisirions peut-être plus la même méthodologie, aussi est il important de faire mention de ces nouvelles approches.

I. PROFILAGE DE L'EXPRESSION DES PROTEINES PAR ELECTROPHORESE 2D

L'une des techniques les plus répandues pour l'analyse différentielle des protéomes est l'électrophorèse bidimensionnelle qui permet de séparer les protéines selon leur point isoélectrique (pI) et leur poids moléculaire (PM). L'électrophorèse bidimensionnelle permet d'obtenir des profils d'expression protéique et de les comparer en fonction de l'intensité des colorations. Elle permet également de repérer des modifications post-traductionnelles qui modifient pI ou PM. Cette méthode essentiellement descriptive donne de nouvelles pistes pour étudier des mécanismes cellulaires mais on se tourne peu à peu vers l'étude des interaction protéine-protéine plus informative quant aux voies de signalisation (Hondermarck 2003).

L'une des approches les plus classiques pour étudier les voies de signalisation est de repérer les changements dans le profil protéique induits par l'inhibition d'une voie de signalisation particulière. Cette approche a, par exemple, permis à Lewis *et al.* d'identifier plus de 20 nouvelles cibles de la voie des MAPK (Lewis *et al.* 2000). De la même façon, Gerner et collaborateurs (Gerner *et al.* 2000) ont identifié 57 protéines régulées lors de l'action de Fas-ligand ; l'utilisation d'inhibiteurs de caspases a montré que la modification de 25 de ces protéines étaient caspases-dépendante et correspondaient aux phases initiales d'induction de l'apoptose. La même analyse pour d'autres apoptogènes (staurosporine, camptothécine) a montré que ces variations n'étaient pas toujours les mêmes lors de l'apoptose, soulignant le fait qu'un signal de mort peut être relayé par des voies de signalisation différentes. Cette approche a permis également de trouver des effets méconnus pour des voies de signalisation pourtant déjà très étudiées. Par exemple, Kanamoto et collaborateurs (Kanamoto *et al.* 2002) ont identifié une cible du TGF- β 1 appelée Raqd51 qui inhibe l'assemblage des complexes de dommage à l'ADN. Le profilage protéique par l'électrophorèse bidimensionnelle permet également de suivre l'évolution de marqueurs de signalisation, au cours de l'évolution d'une maladie, comme l'activation constitutive de Rho et Rac GTPases qui sont spécifiques de certains stades de cancer.

II. SHOTGUN

Le pouvoir résolutif de la 2D-E est grand mais ses limites (séparation de protéines de points isoélectriques très basiques, hydrophobes ou de haut poids moléculaire) poussent parfois à recourir à d'autres systèmes de séparation. Par exemple, le SDS-PAGE suivi de la digestion des bandes protéiques d'intérêt, puis de la séparation des produits de digestion par chromatographie liquide couplée directement au spectromètre de masse en tandem (MS-MS) (Li *et al.* 2003). L'une des alternatives au profilage par 2D-E est la chromatographie liquide multidimensionnelle couplée à des spectromètres de masse en tandem. Cette alternative permet de séparer les produits de digestion d'un mélange protéique complexe avant leur analyse par spectrométrie de masse (McDonald et Yates 2003). Le différentiel ne se fait plus sur un spot protéique mais sur la variation de détection d'un ou plusieurs peptides de digestion. Ces méthodes de « shot gun » sur peptides de digestion permettent de détecter les peptides issus de protéines globalement très hydrophobes ou très basiques qui n'étaient pas détectables en 2D-E. Les plus récentes analyses ont montré la détection dans un même run de 5130 ORF chez l'humain soit 15% des ORF prédits alors que l'électrophorèse bidimensionnelle n'en détecte que 5% (Resing *et al.* 2004). Elles permettent aussi d'analyser le remaniement de domaines très hydrophobes tels que ceux des centrosomes (Andersen *et al.* 2003), des radeaux lipidiques (Foster *et al.* 2003) ou des microsomes (Han *et al.* 2001).

III. MARQUAGE ISOTOPIQUE

L'une des difficultés principales de la quantification relative des peptides par spectrométrie de masse est la compétition entre les peptides d'un même mélange pour l'ionisation. Il est difficile de comparer les signaux d'un même peptide entre deux runs où il n'était pas en même proportion dans le mélange. C'est pourquoi ont été mises au point des méthodes de marquage isotopique des protéines pour quantifier et caractériser les peptides de deux conditions en seul run.

Typiquement, avant mélange, les peptides provenant des différentes conditions sont greffés sur les cystéines ou les lysines par des marqueurs isotopiquement distincts (^{12}C vs ^{13}C) (ICAT, isotope-coded affinity tag) (Goshe *et al.* 2003) (Figure 18) ou alors les cellules sont cultivées dans les différentes conditions avec des acides aminés isotopiquement distincts (SILAC, stable isotope labeling by aminoacids in cell culture) (Ong *et al.* 2003). Il en résulte un décalage dans les masses, mesuré par le spectromètre de masse, qui permet d'identifier la provenance de chaque peptide et de quantifier l'intensité relative des pics sur le même spectre.

Une variante est possible en digérant séparément les échantillons par la trypsine dans de l'eau ^{18}O et ^{16}O (Yao *et al.* 2001). La trypsine transférant deux atome d'oxygène par peptide permet d'obtenir un décalage de 4 Da selon la provenance du peptide. La combinaison shot gun/marquage isotopique a permis d'identifier 528 protéines dont l'abondance est régulée par c-myc (Shiio *et al.* 2002). Les méthodes de marquage isotopiques n'ont cependant pas donné de résultats pour les protéines très faiblement exprimées (Ghaemmaghami *et al.* 2003 ; Parker *et al.* 2004).

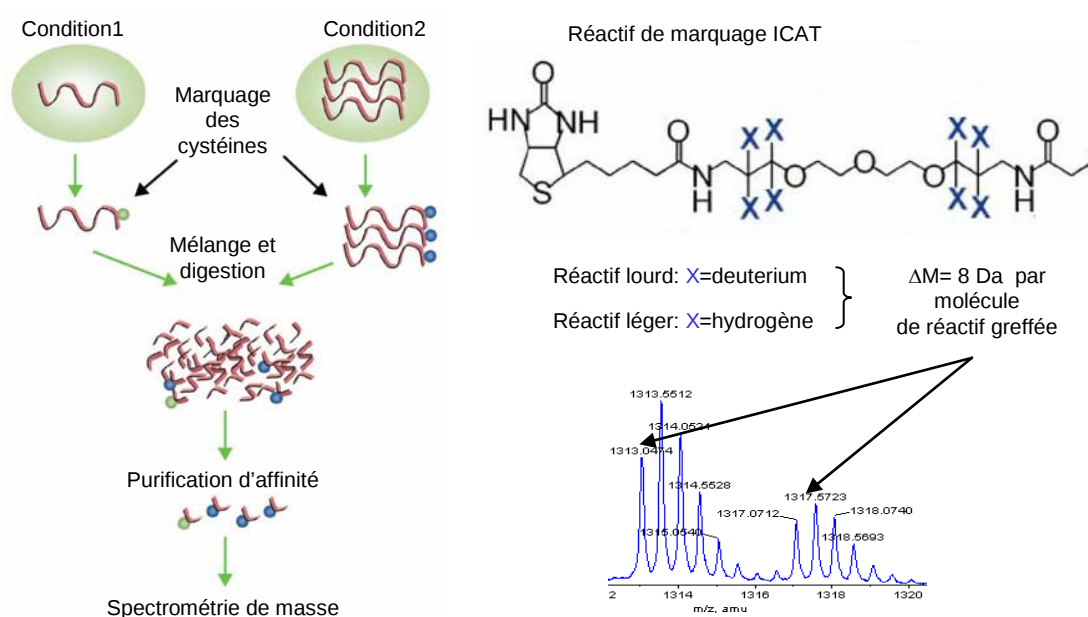


Figure 18. Schéma explicatif d'un marquage isotopique. Le marquage des échantillons par des réactifs isotopiquement distincts entre les différentes conditions permet de leur faire subir les mêmes traitements et de mesurer directement leur quantité relative à partir du spectre de masse (ICAT, isotope-coded affinity tag).

IV. MICROPUCES

Les micropuces semblent, à priori, un bon moyen pour quantifier quelques centaines de protéines en parallèle (Zhu et Snyder 2003). Les micropuces à anticorps fabriquées par l'immobilisation d'anticorps sur des supports solides sont incubées avec des mélanges de protéines marquées avec des fluorophores qui diffèrent selon les conditions. La quantification est directement réalisée en mesurant la fluorescence dans la longueur d'onde spécifique à chaque fluorophore. Cette approche a permis de détecter la régulation par radiation de cellules cancéreuses de plusieurs molécules de signalisation incluant p53 et des ligands de la famille du TNF (Sreekumar *et al.* 2001). Une autre approche par puce à protéines est de fixer les extraits à tester sur le support solide et d'incuber cette fois-ci des anticorps couplés aux fluorophores (Haab *et al.* 2001). Des seuils de détection de 1 ng/mL sont compatibles avec les

taux physiologiques d'expression des protéines mais le profilage de seulement quelques centaines de protéines à la fois et le haut niveau de qualité d'anticorps requis rend, pour l'instant, cette méthode inadaptée pour des études exhaustives ou sans *a priori*.

V. ETUDE DE LA PHOSPHORYLATION

Très souvent les modifications post-traductionnelles sont présentes avec une très faible stoechiométrie et sont difficiles à détecter dans les échantillons biologiques complexes. C'est pourquoi, la purification par affinité de ces modifications post-traductionnelles est une stratégie importante pour enrichir l'échantillon en une espèce particulière de modifications post-traductionnelles. Les modifications post-traductionnelles les plus souvent étudiées sont la phosphorylation, la glycosylation, la farnésylation et l'ubiquitination. Dans l'étude des partenaires de la kinase Akt, la modification post-traductionnelle qui nous intéresse plus particulièrement est la phosphorylation. C'est pourquoi je décrirai maintenant les méthodes d'analyse de la phosphorylation.

A. Anticorps

Les méthodes pour enrichir un échantillon en protéines ou en peptides phosphorylés tirent partie de propriétés particulières du phosphate dont l'immunoréactivité, la charge et la réactivité chimique. Les anticorps anti-phospho-tyrosine sont très efficaces pour enrichir les peptides tyrosine-phosphorylés. Cette approche a permis par exemple l'identification de cibles de la signalisation de l'insuline (Ibarrola *et al.* 2004) et de la thrombine (Maguire *et al.* 2002). Les anticorps reconnaissant spécifiquement les sérines/thréonines phosphorylées seules ne sont hélas pas faciles à produire et de meilleurs résultats ont été obtenus avec des anticorps reconnaissant les sérines/thréonines phosphorylées au sein d'un motif peptidique particulier comme l'anticorps PAS (phospho Akt substrate, Gronborg *et al.* 2002) que nous avons utilisé dans notre étude.

B. « Immobilized metal affinity chromatography » (IMAC)

Une alternative à cette purification d'affinité par anticorps est l'« immobilized metal affinity chromatography » (IMAC) dans laquelle une résine, chélatant les ions métalliques trivalents tels que le Fe(III) ou le Ga(III), est utilisée pour retenir les phosphopeptides par interactions ioniques (Posewitz et Tempst 1999). Malheureusement, l'IMAC peut également retenir les peptides porteurs d'autres fonctions acides ou donneuses d'électrons qui donnent

lieu alors à de faux positifs. Ficarro et collaborateurs ont amélioré sensiblement la spécificité par méthylesterification des fonctions acides avant l'IMAC (Ficarro *et al.* 2002); ce qui a permis d'identifier 383 sites de phosphorylation en levure. Ces approches ont également été utilisées sur cellules humaines pour l'analyse du phosphoprotéome des lymphomes de type B et des cellules leucémiques myéloïdes (Shu *et al.* 2004). L'échantillon peut être simplifié en le passant préalablement sur une colonne échangeuse d'anions qui permet également d'augmenter le rendement pour les peptides mono-phosphorylés qui sont évidemment moins retenus par l'IMAC que les peptides pluri-phosphorylés.

C. β -élimination des phosphates

Une troisième stratégie pour étudier les phosphorylations est leur remplacement par des groupements attachés covalamment à la protéine et qui présentent des facilités de purification (Oda *et al.* 2001 ; Zhou *et al.* 2001 ; Qian *et al.* 2003). Ces procédés requièrent des étapes de dérivation et de purification des produits pendant lesquelles il faut faire très attention en terme de reproductibilité pour récupérer l'ensemble des phosphopeptides. La β -élimination du phosphate pour produire des déhydroalanines ou des β méthyl-déhydroalanines à partir de phospho Ser/Thr par des additions sur les carbones alpha ou bêta donne des produits hétérogènes qui sont difficilement différenciables.

Une étape prometteuse d'utilisation de cette β -élimination est de la faire suivre de l'addition d'une cystéamine qui transforme pSer ou pThr en analogues de la lysine qui sont alors clivables spécifiquement par des enzymes. Les sites de phosphorylation sont alors cartographiés directement à partir des profils de digestion enzymatique (Knight *et al.* 2003).

VI. ETUDE DES INTERACTIONS PROTEINE-PROTEINE

Les molécules de signalisation agissent rarement seules mais plutôt en complexe avec d'autres protéines. La spécificité de la signalisation et son effet biologique sont contrôlés par la localisation subcellulaire des protéines, la sélectivité et la cinétique d'interaction entre les protéines. C'est pourquoi la comparaison des profils d'interactions protéine-protéine dans des contextes donnés est un bon moyen de comprendre la régulation de la signalisation cellulaire et les fonctions qu'y jouent les différents acteurs protéiques. Plusieurs méthodes ont été développées pour décrire de façon systématique les interactions protéine-protéine encore appelées « interactome ».

Depuis longtemps maintenant, l'un des modèles privilégiés pour l'étude des interactions protéine-protéine à haut débit a été la levure en utilisant la purification par double-affinité (Gavin *et al.* 2002), des co-immunoprécipitations en ciblant chaque protéine individuellement (Ho *et al.* 2002), ou en utilisant un criblage double hybride (Uetz *et al.* 2000; Ito *et al.* 2001). Ces approches ont permis la détection des partenaires pour chaque protéine ciblée puis, en confrontant les données, de dresser des cartes d'interactions protéiques qu'on nomme « interactomes ». Mais ces approches ne permettent pas d'étudier finement la composition des complexes multi-protéiques comme leur abondance relative et leur composition exacte.

A. Criblage double-hybride

Le système double-hybride de levure est une technique puissante pour étudier des interactions protéine-protéine. L'ADNc de la protéine appât est fusionné avec le domaine DNA-binding du facteur de transcription de levure gal4 et les ADNc des protéines testées sont fusionnés avec le domaine d'activation transcriptionnelle de ce même Gal4 (Figure 19). Si la protéine testée interagit avec le leurre, ils reconstituent un Gal4 fonctionnel qui active l'expression d'un gène rapporteur inductible par Gal4. De cette façon, deux différentes protéines peuvent être testées pour leur capacité d'interaction qui se traduit en une activité transcriptionnelle qui peut être mesurée (Toby et Golemis 2001). En outre, de nouveaux partenaires peuvent être trouvés en examinant une protéine entière ou un domaine simple contre une bibliothèque d'autres protéines en utilisant ce système. C'est cette recherche de partenaires sans *a priori* combiné au haut débit qui ont fait du double hybride une méthode de référence en protéomique fonctionnelle. Bien que le double-hybride soit une méthode maintenant répandue (Mrowka *et al.* 2001), il est difficile de l'utiliser pour identifier des interactions qui ont besoin de co-facteurs ou de modifications post-traductionnelles absents dans la levure. C'est pourquoi des approches en cellules mammifères ou humaines ont été développées. L'analyse double hybride a été transposée en cellules de mammifères pour étudier des interactions protéine-protéine *in vivo* (Lee et Lee 2004).

L'approche « two steps-two-hybrid » est une adaptation de la méthode double hybride classique (Poustovoitov *et al.* 2004). Son but est d'identifier les protéines qui interagissent avec un domaine relativement petit, fonctionnellement significatif d'une protéine d'intérêt. Dans cette méthode, un criblage de première intention est exécuté pour identifier les protéines qui interagissent avec la protéine de type sauvage. Après, chacune des proies positives dans ce

premier crible est examinée dans un deuxième crible contre une protéine mutée non fonctionnelle pour déterminer si la proie est un effecteur ou un régulateur de la protéine leurre. L'utilisation du double hybride pour étudier la signalisation du TGF- β de *C. elegans* a permis d'identifier 71 interactions dont 90% ont été vérifiés *in vivo*. L'utilisation de la stratégie RNAi a montré que 10% sont bien nécessaires à la croissance de l'animal (Tewari *et al.* 2004). Cependant, le double-hybride en levure est parfois critiqué pour le nombre de faux-positifs obtenus.

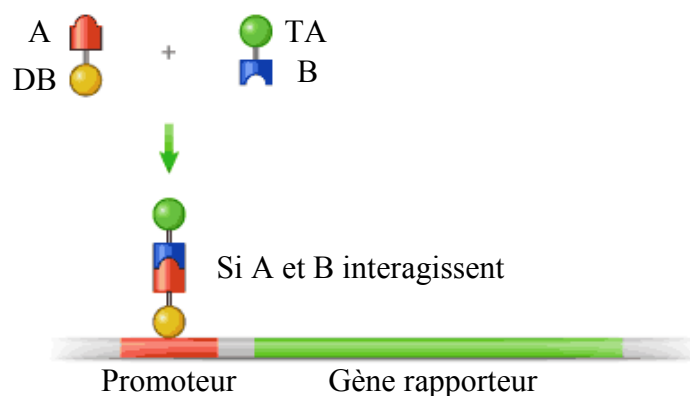


Figure 19. Principe du système double-hybride. La protéine leurre A dont on veut identifier les partenaires est fusionnée avec le domaine de liaison à l'ADN (DB) de gal4 et les protéines codées par la banque sont fusionnées avec le domaine transactivateur de Gal4. Si la protéine testée interagit avec l'appât alors un gal4 fonctionnel est rassemblée et le gène rapporteur peut s'exprimer.

B. « Blue native–PAGE » (BN-PAGE)

L'électrophorèse bidimensionnelle en gel natif a été mise au point pour séparer des complexes protéiques intacts. L'isofocalisation native est un bon moyen de séparer ces complexes en gardant leur abondance relative et leur stœchiométrie. Toutefois, cette technique est limitée par l'insolubilité de certains complexes protéiques qui tendent à précipiter aux alentours de leur point isoélectrique et par la taille des pores des matrices commercialisées (acrylamide, agarose) qui ne permettent pas la migration de très gros complexes protéiques (inférieur à 1000 kDa). Le blue native–PAGE (BN-PAGE) est une séparation des complexes au cours de laquelle leur mobilité est basée sur leur taille, sur leur forme et sur les charges négatives du bleu de Coomassie qu'ils accrochent (Schagger et von Jagow 1991; Schagger *et al.* 1994; Schamel et Reth 2000). Cette méthode est bien plus résolutive que la gel-filtration ou le gradient de sucrose (Schagger et von Jagow 1991; Schagger *et al.* 1994). BN-PAGE a été développé pour la séparation de protéines de fraction de membrane ou de fractions d'organites et limitée à des échantillons peu complexes issus

d'une purification préalable. En combinaison avec les outils de spectrométrie de masse, cette méthode a permis d'identifier nombre de protéines contenues dans les complexes multi-protéiques.

C. Co-immunoprécipitation

L'une des méthodes les plus utilisées pour savoir si deux protéines interagissent dans la cellule est la co-immunoprécipitation. C'est celle que nous avons choisi pour identifier les partenaires de la kinase Akt. Elle est basée sur la qualité d'un anticorps qui doit reconnaître spécifiquement et stablement une protéine dans un complexe ; le but étant de récupérer les partenaires accrochés à la cible. Pour récupérer ce complexe, les anticorps peuvent être fixés sur différents types de supports (billes/colonnes/plaques) et de constituants (agarose /sépharose/billes magnétiques). De cette manière, les protéines n'interagissant pas avec la protéine d'intérêt pourront être éliminées par rinçage avec des tampons non dénaturants. L'identification ou la confirmation de partenaires dans le co-immunoprécipitat se fera par spectrométrie de masse et peuvent être confirmées par Western-blotting. La diversité physico-chimique des interactions protéine-protéine fait qu'il est nécessaire d'adapter méthode et tampons d'immunoprécipitation à chaque condition expérimentale nouvelle. L'un des avantages de cette méthode par rapport à des approches plus modernes est la possibilité de travailler sur des protéines endogènes sans avoir recours à la transfection des cellules pour surexprimer la cible. Toutefois le recours à cette transfection est parfois nécessaire pour augmenter le rendement de l'immunoprécipitation ou pour ajouter un « tag » ou étiquette (myc, his, gst, hémagglutinine...) à la protéine si aucun anticorps efficace dirigé contre elle n'est disponible. On utilise alors un anticorps dirigé contre ce tag. Les immunoprécipitats sont séparés par SDS-PAGE ou digérés en solution avant d'être analysés en LC-MS-MS. Par exemple, chez la levure, les cribles indépendents de 725 protéines marquées par un flag ont permis la purification de 232 complexes protéiques différents composés de 1440 protéines différentes (Ho *et al.* 2002).

Malheureusement, on estime à 30% le taux de faux positifs dû à une aspécificité de purification et à une difficulté de reproduction expérimentale entre les différentes conditions (Bader et Hogue 2002). Le marquage isotopique semble être une bonne réponse face à ce problème. En effet, avec un marquage SILAC, Blagoev et collaborateurs (Blagoev *et al.* 2003) ont pu co-immunoprécipiter 228 protéines avec le récepteur à l'EGF dont 28 interagissent de manière dépendante de la stimulation du récepteur.

D. Retard sur gel

Le principe du retard sur gel (EMSA, Electromobility-shift assay) est basé sur la réduction de la distance parcourue en un temps donné dans un gel non dénaturant par un ADN, un ARN, ou une protéine quand un partenaire leur est attaché. L'analyse est rapide, sensible (radioactivité), techniquement simple et répandue pour étudier l'interaction acide nucléique-protéine et protéine-protéine. La liaison de la protéine avec son partenaire dans les gels non-dénaturants mène habituellement à une réduction de sa mobilité électrophorétique. La réussite de ce type d'expérience dépend du tampon de migration (concentration ionique et pH), de la température, du compétiteur non spécifique ou de la concentration et/ou composition de gel (Roder et Schweizer 2001). Il n'y a pas non plus pour cette méthode de protocole standard.

E. « Glutathion S transferase – pull down »

Le « Glutathion S transferase – pull down » (GST-pull down) est une purification par affinité d'une protéine fusionnée au « tag » de la GST grâce à la grande affinité du glutathion pour la GST. Cette méthode est devenue une approche commune dans l'étude des interactions protéine-protéine. Des analyses de GST-pull down ont été employées pour identifier de nouveaux partenaires ou pour confirmer l'interaction de protéines qui a été précédemment découverte par d'autres méthodes telles que le criblage double-hybride en levure ou le phage display (Malloy *et al.* 2001). Dans une analyse dérivant de GST, la protéine leurre est fusionnée avec la GST-pull down puis purifiée et fixée sur la résine couplée au glutathion. Une fois liée, l'amorce est incubée avec un lysat de cellules ou un autre mélange de protéine afin d'accrocher les partenaires potentiels de la protéine leurre (Brymora *et al.* 2001 20).

F. Méthode « phage-display »

Le « phage-display » est basé sur la capacité du bactériophage de présenter les protéines sur son manteau extérieur (Mourez et Collier 2004). Divers peptides peuvent être présentés tels que des peptides, des fragments d'anticorps, des domaines de protéines correspondant aux fragments de gènes ou de cDNAs (Figure 20). Les bibliothèques de fragments de peptides et de gènes sont particulièrement utiles pour caractériser les domaines d'interactions entre les protéines, telles que des interactions ligand-récepteur. Les différents bactériophages présentant des protéines de la bibliothèque sont passés sur des colonnes d'affinité contre la protéine d'intérêt. Les bactériophages retenus sont réamplifiés dans les

bactéries et séquencés pour connaître le peptide qui avait été retenu par la colonne. Des interactions entre les protéines présentées par le bactériophage et la protéine cible peuvent être identifiées rapidement et caractérisées en haut débit.

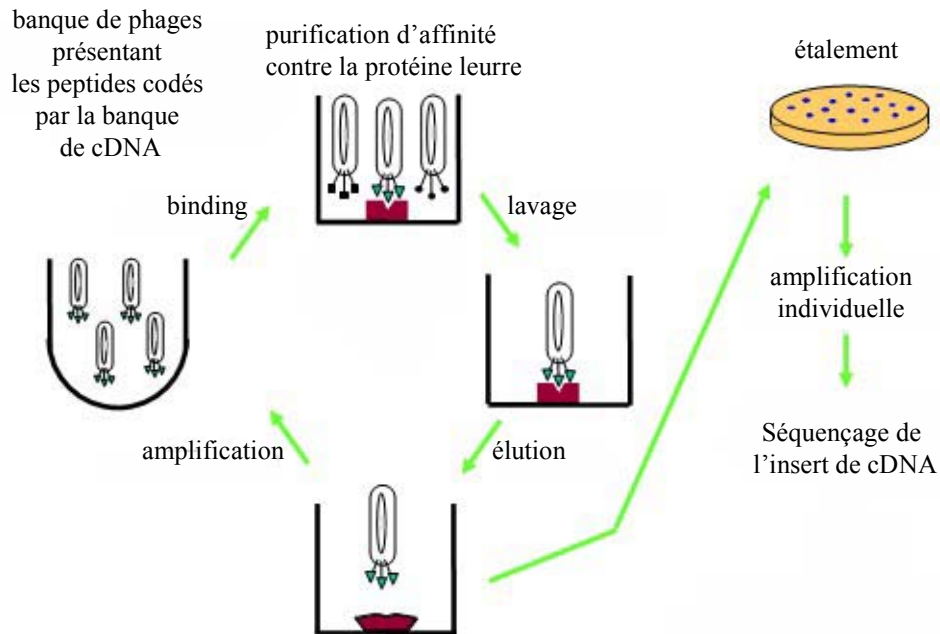


Figure 20. Principe de la méthode phage display. La capacité des phages à présenter des peptides à leur surface est utilisée pour purifier par affinité les phages présentant des protéines capables d'interagir avec la protéine appât. Il reste alors à séquencer le cDNA correspondant pour connaître la nature de la protéine interagissant.

G. tandem affinity purification (TAP)

Récemment, une méthode de double purification dite TAP a été développée comme outil permettant la purification rapide des complexes de protéines exprimées à leur niveau normal dans la cellule grâce à deux purifications successives par affinité (Rigaut *et al.* 1999). La méthode de TAP exige la fusion en C ou N-terminal d'un tag (étiquette) avec la protéine leurre. À partir d'un nombre relativement petit de cellules, des complexes macromoléculaires actifs peuvent être isolés et employés pour des applications multiples (Figure 21). Pour adapter cette méthode aux cellules de mammifères, un vecteur retroviral spécial a été créé pour l'expression à des niveaux physiologiques de protéines fusionnées au TAP-tag. La succession de deux purifications différentes grâce à la combinaison de deux étiquettes différentes d'affinité a considérablement réduit le nombre de protéines non spécifiques dans le mélange. Le degré de pureté des complexes protéiques purifiés est compatible avec l'identification par spectrométrie de masse. Combinée à la LC-MS-MS, la méthode TAP a

permis par exemple d'identifier 221 interactions induites par le TNF- α dont 80 nouvelles (Puig *et al.* 2001).

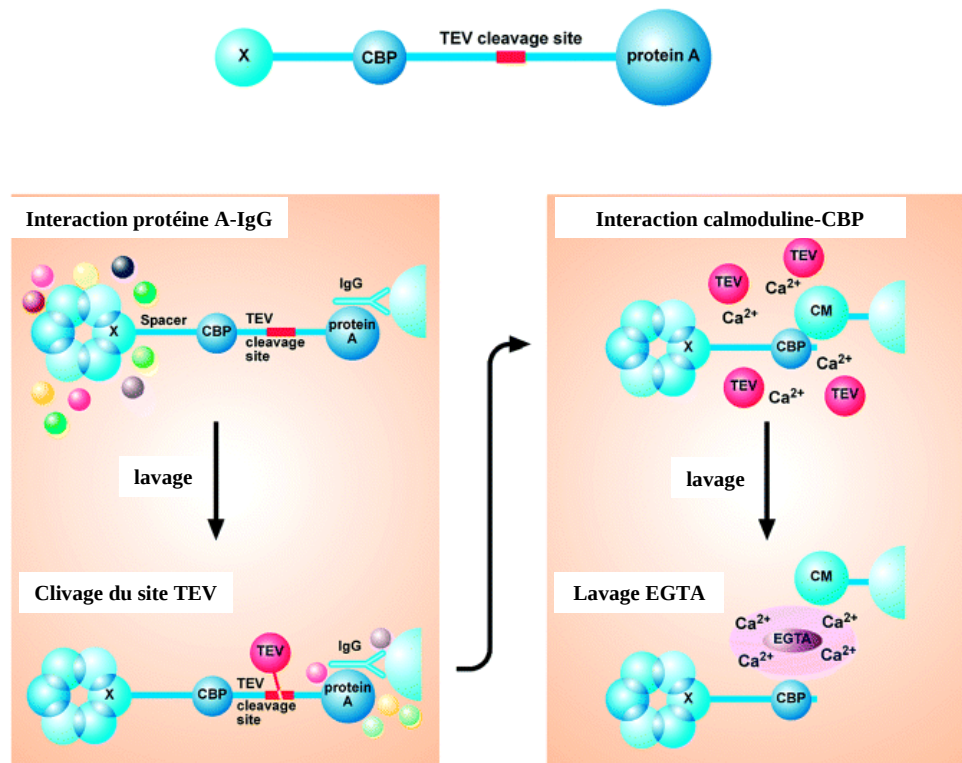


Figure 21. Méthode de double purification d'affinité. La protéine appât est fusionnée à deux étiquettes d'affinité (ici CBP et protéine A) séparée par un site de clivage TEV. Les protéines en interaction sont purifiées par deux chromatographies d'affinité successives. Dans la première colonne d'IgG, la protéine A est retenue et l'élution se fait après lavage par clivage protéasique du site rare TEV. L'éluat est ensuite repassé dans une seconde colonne à calmoduline qui retient la CBP. Après lavage, la protéine appât et ses partenaires sont élués par un tampon EGTA.

CHAPITRE 5: SPECTROMETRIE DE MASSE POUR L'ETUDE DES PROTEINES

L'une des avancées majeures en protéomique a été la possibilité d'analyser les protéines par spectrométrie de masse. Cette avancée a valu aux inventeurs John B. Fenn (Etats-Unis), Koichi Tanaka (Japon) et Kurt Wüthrich (Suisse) le prix nobel de chimie en 2002. L'ionisation est l'étape nécessaire à l'analyse des molécules par spectrométrie de masse. Avant les années 80, les processus d'ionisation (par impact électronique ou chimique) ne permettaient d'analyser que de petites molécules inférieures à 1000 Da et dans des conditions souvent drastiques devant la fragilité des biomolécules. A la fin des années 80, deux nouvelles méthodes d'ionisation dites « douces » ont été développées : l'ionisation de type « electrospray ionisation » (ESI) (Fenn *et al.* 1989) et l'ionisation de type « matrix assisted laser desorption/ionisation » (MALDI) (Hillenkamp *et al.* 1991). Ces deux innovations ont permis l'ionisation de biomolécules intactes et ont ouvert à la spectrométrie de masse un nouveau champ d'investigation : la biologie. Ces dernières années, l'utilisation de la spectrométrie de masse et des données issues du séquençage des génomes initié dans les années 90 a permis l'essor de la protéomique grâce à l'identification et à la caractérisation sans a priori des protéines. Sans les outils de la spectrométrie de masse nous n'aurions pas pu identifier de nouveaux partenaires de Akt. Ces outils à l'interface de plusieurs disciplines scientifiques (biologie, chimie, physique, bioinformatique) étant une originalité de notre étude, je décrirai dans ce chapitre les outils de spectrométrie de masse que nous avons utilisés pour identifier des protéines.

I. LES SOURCES ADAPTEES AUX BIOMOLECULES

A. Ionisation type « electrospray ionisation » (ESI)

L'ESI ou électronébulisation est l'émission, en phase gazeuse, d'ions initialement en solution grâce à un champ électrique intense. Pratiquement, l'ESI se réalise à pression atmosphérique et la particularité de cette ionisation est de donner des ions plurichargés de type $[M+nH]^{n+}$. C'est pourquoi l'ESI permet l'analyse de protéines de hautes masses (supérieures à 100 kDa) même avec des analyseurs de gamme de masse limitée.

L'échantillon en solution est introduit dans une aiguille à laquelle on applique un haut voltage électrique (Figure 22). Ce champ électrique provoque la nébulisation de l'échantillon en un nuage de gouttelettes chargées qui sont entraînées dans l'analyseur du spectromètre de masse grâce à la différence de pression (analyseur sous vide) et grâce à des lentilles électrostatiques (gradient de champ électrique). Durant ce transport, des explosions coulombiennes (tension surfacique) divisent les gouttelettes en gouttelettes de plus en plus petites. Lors du transport les gouttelettes passent également à travers un courant de gaz (azote souvent) qui permet l'évaporation du solvant (Chowdhury *et al.* 1990).

Comme le rendement ionisation/désorption des molécules (sensibilité de mesure) dépend de la densité de charges des gouttelettes (concentration en échantillon) et non du débit du spray, la source a été progressivement miniaturisée jusqu'à devenir « nanoélectrospray » et permettre un temps d'analyse de 30 minutes avec 1 ou 2 μL d'échantillon grâce à un débit de 50 à 100 nL/min et une sensibilité de l'ordre de la dizaine de femtomoles.

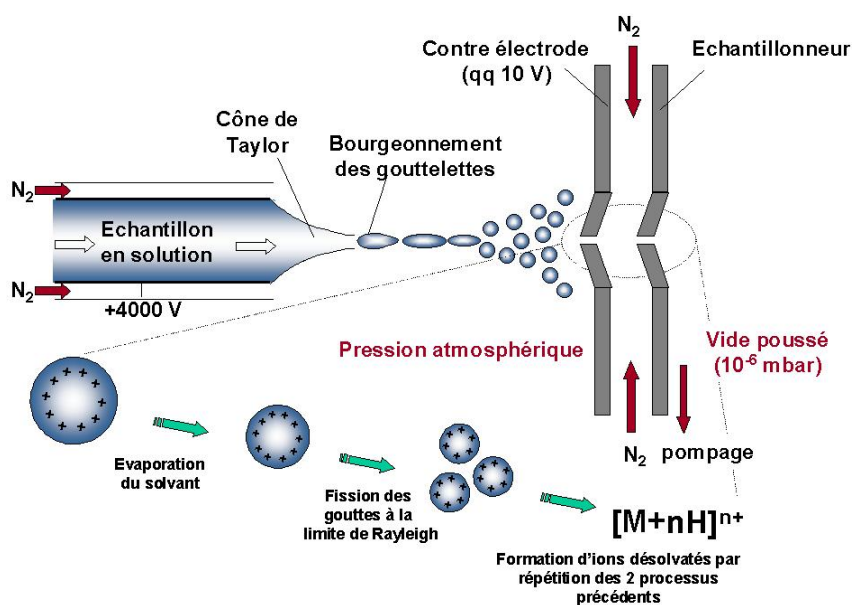


Figure 22. Représentation schématique du mode d'ionisation par électronébulisation. Extraite après accord du site internet de club jeune de la société française de spectrométrie de masse (<http://cjsm.sfsm.info>)

Pour l'analyse de peptides nous utilisons une solution acidifiée pour favoriser la protonation des sites basiques des peptides : lysines, arginines, ou extrémité N-terminale. On travaille alors en mode d'ionisation positif sur le spectromètre de masse.

Pour la détection d'oligonucléotides ou de modifications post-traductionnelles type phosphorylation, les ions les plus facilement obtenus sont des ions globalement négatifs, on se

place donc en solution basique pour favoriser la déprotonation des sites acides et on inverse les polarités du spectromètre de masse, on dit qu'on travaille en mode négatif.

Les sels et les détergents classiquement utilisés dans les tampons biologiques perturbent l'ionisation des peptides par compétition et forment avec eux des adduits multiples qui divisent le signal d'intérêt le rendant moins détectable (Mann et Wilm 1995). C'est pourquoi, une étape de dessalage précède souvent l'électrospray ; dessalage réalisé par chromatographique (C18) soit directement, soit directement couplé au spectromètre de masse, soit séparément et de façon manuelle (ZIPTIP, Poros R2). Vu le nombre moyen de spots ou de bandes protéiques obtenus dans notre étude, nous avons opté pour le dessalage manuel.

B. Ionisation type matrix assisted laser desorption/ionisation (MALDI)

La méthode MALDI utilise un faisceau laser pulsé pour désorber et ioniser sous vide un mélange matrice/échantillon co-cristallisés sur une surface métallique (Figure 23). A la fin des années 80, l'idée d'ajouter une matrice en large excès (1 000 :1 10000 :1) absorbant à la longueur d'onde du laser afin de protéger les analytes a considérablement amélioré la technique (Hillenkamp et Karas 1990). Les principaux atouts de cette méthode MALDI pour l'étude des biomolécules sont la sensibilité (sub femtomole), la rapidité (quelques secondes par analyse), une bonne tolérance aux sels des tampons et une gamme de mesure jusque 500 kDa (Tanaka *et al.* 1988). C'est pourquoi, nous avons utilisé en première approche une analyse MALDI-TOF de nos digestats tryptiques.

L'irradiation laser (souvent de type laser à azote 337 nm) éjecte des molécules d'échantillon et de matrice en phase gazeuse. Les ions monochargés $[M+H]^+$ sont en général majoritaires dans les spectres MALDI ce qui rend leur analyse relativement simple (Zhang *et al.* 2003). La production d'ions par MALDI dépend pour beaucoup de la préparation de l'échantillon, du type de matrice, de la présence de sels, du pH. Toutefois, comme elle dépend également des propriétés physico-chimiques des analytes et bien que l'ionisation MALDI présente une bonne tolérance aux sels, on peut malheureusement considérer que la préparation optimale est échantillon-dépendante.

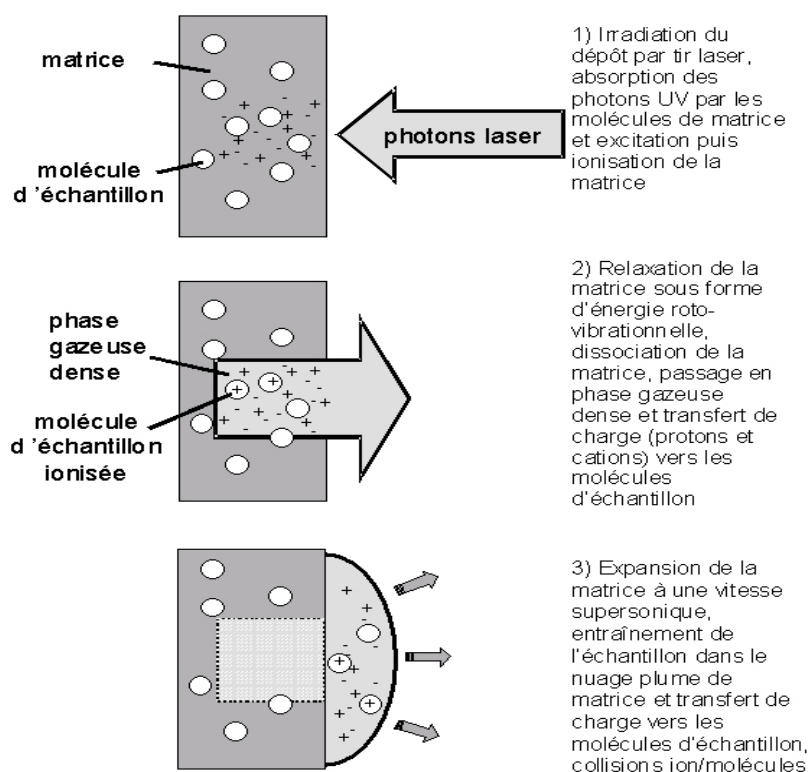


Figure 23. Schéma explicatif de l'ionisation de type MALDI. Extraite après accord du site internet de club jeune de la société française de spectrométrie de masse (<http://cjsm.sfsm.info>)

Il existe plusieurs types de matrice (Tableau 6) dont le choix se fait suivant la nature de l'analyte. La matrice doit toujours absorber dans la longueur d'onde du laser pour favoriser la désorption et protéger l'échantillon.

type de matrice	absorption (nm)	applications
acide α -cyano-4-hydroxycinnamique (α -HCCA)	337 355 266 (UV)	peptides, protéines, oligonucléotides, glycoprotéines
acide 3,5-diméthoxy-4-hydroxycinnamique (acide sinapinique)	337 355 266 (UV)	protéines
acide 2,5-dihydrobenzoïque (DHB)	337 355 266 (UV), 2940 10600 (IR)	peptides, oligosaccharides, glycolipides, glycoprotéines
acide 3-hydroxypicolinique	337 355 266 (UV)	oligonucléotides

Tableau 6. Propriétés d'absorption et applications des différents types de matrices

La méthode en sandwich consiste à insérer l'analyte entre deux couches de matrice. Plutôt employée avec les acides cinnamiques, elle génère de petits cristaux très homogènes et une homogénéité des spectres sur tout le dépôt. Cette méthode se prête bien aux analyses automatiques et à celles qui requiert une grande précision de mesure.

La méthode de la goutte séchée (matrice mélangée directement à l'analyte) génère une hétérogénéité des cristaux qui se retrouvent dans la qualité des spectres. Ce mode de

dépôt se prête bien à l'analyse manuelle comme la nôtre dans laquelle on recherche une zone où le signal est concentré mais on perd en précision si on se déplace sur le spot. Ces cristaux étant très résistants aux impulsions laser ils se prêtent bien aux analyses de type MALDI-MS-MS.

II. L'INTERFACE

L'interface est la partie du spectromètre qui transmet les analytes ionisés à l'analyseur. Elle a plusieurs rôles :

- Amener les ions d'une pression atmosphérique de la source au vide de l'analyseur (10^{-9} à 10^{-10} bars) suivant un gradient progressif de pression et de champs électriques
- Refocaliser les ions expulsés au hasard en une même direction grâce à un système de lentilles électrostatiques
- Terminer la désolvatation en passant les ions dans un courant d'azote.

Au cours de leur accélération dans le gradient de champs électrique de l'interface, les ions accumulent une énergie cinétique qui peut atteindre un tel niveau que leur collision avec les molécules de gaz induit leur fragmentation. Ainsi, plus on applique une tension d'accélération V_c forte ou une pression forte de gaz à l'interface, plus il y a de risque de fragmentation à l'interface.

III. LES ANALYSEURS

Il existe maintenant une grande variété d'analyseurs pouvant être couplés aux sources MALDI ou ESI. On obtient le nom des appareils en combinant les sigles :

- ESI-analyseur quadripole, ESI-trappe ionique (ESI-IT) (van Berkel et coll 1990), ESI-temps de vol (ESI-TOF) (Verentchikov *et al.* 1994), ESI-résonance cyclotronique (ESI-FTICR) (Henry *et al.* 1989)
- MALDI-TOF, MALDI-IT ou MALDI-Q-TOF (Zhang *et al.* 2003)

Leurs différences résident essentiellement sur la sensibilité, la résolution, la rapidité de mesure, la gamme de masses mesurables (Tableau 7) et surtout dans la capacité à fragmenter une ou plusieurs fois les ions pour les séquencer ou les caractériser.

La résolution est la capacité de l'analyseur à différencier deux ions de masse proche. Elle se quantifie par la relation $M/\Delta M$ où M est la masse de l'ion mesuré et ΔM le plus petit

écart permettant de le différencier d'un ion de masse voisine. Suivant le type de mesure il faut souvent choisir entre résolution et grande gamme de masses mesurables.

analyseurs	résolution	gamme de masse (m/z)
quadripole	2000	8000
magnétique	20000	20000
temps de vol	20000	100000
trappe ionique	5000	6000
cyclotron à résonance	1000000	4000

Tableau 7: résolution et masse maximale mesurable des différents analyseurs

A. Le quadripôle

Le quadripôle est un analyseur le plus souvent couplé à une source ESI. Il est capable de sélectionner des ions d'intérêt dans un flux continu d'ions grâce à leur trajectoire qui dépend du rapport masse sur valence (m/z). Comme son nom l'indique, le quadripôle est constitué de quatre électrodes reliées deux à deux (Figure 24). Les trajectoires des ions sont corrigées grâce au balayage des valeurs U et V appliquées à ces électrodes. Seuls les ions dont le rapport m/z correspond aux valeurs U et V choisies (ions résonants) auront une trajectoire stable et arriveront jusqu'au détecteur. Les autres ions entreront en collision avec les électrodes et seront éliminés.

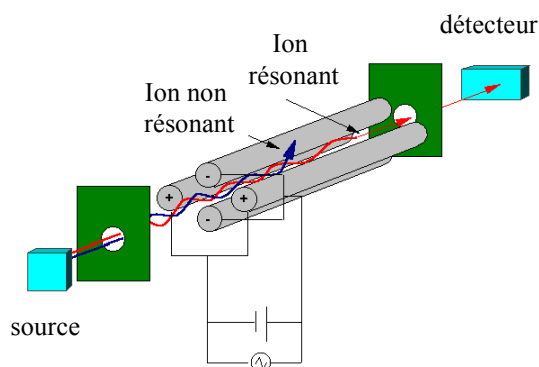


Figure 24. Représentation schématique du quadripôle

B. L'analyseur temps de vol (TOF)

L'analyseur TOF mesure le temps nécessaire pour un ion préalablement accéléré de traverser une zone libre de champ électrique et d'atteindre le détecteur. Comme la vitesse de l'ion est inversement corrélée à son rapport m/z et que l'ionisation MALDI donne essentiellement des ions monochargés, plus la masse de l'ion est grande plus il met de temps à

traverser la zone. Le couplage MALDI-TOF est celui que j'ai le plus employé durant ma thèse. C'est pourquoi je détaillerai plus précisément les analyses possibles en MALDI-TOF.

1) *Mesure MALDI-TOF en mode linéaire*

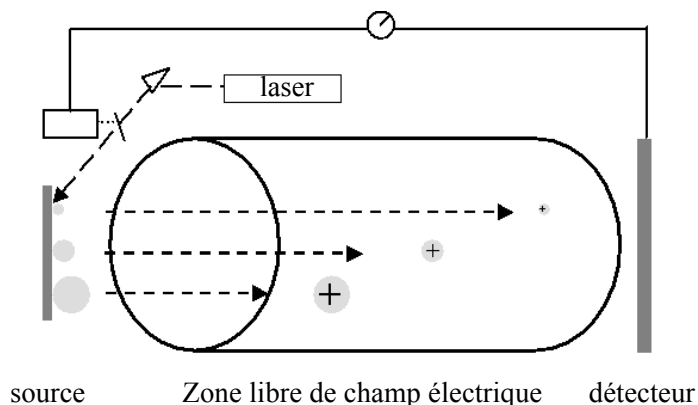


Figure 25. Schéma explicatif de l'analyse temps de vol en mode linéaire

Les ions ionisés à la source ne font qu'un trajet dans la zone libre de champ électrique et le détecteur mesure directement leur masse (Figure 25). Ce mode de mesure a une bonne sensibilité mais une résolution moyenne ($\Delta M/M=1000$) (Alterman *et al.* 2004) due à une distribution initiale en énergie cinétique hétérogène, des collisions à la source qui dispersent les énergie cinétiques et l'augmentation des risques de collision par l'emploi de haut potentiel pour travailler dans les hautes masses.

2) *Extraction retardée (ER)*

Le délai entre ionisation et extraction (captation par l'analyseur) entraîne une dispersion spatiale des ions due à des énergies cinétiques différentes et donc une perte de résolution. L'extraction retardée (DE, delayed extraction) refocalise les ions aux énergies cinétiques différentes en leur donnant le même délai d'extraction grâce à une lentille d'extraction. La résolution est alors multipliée par 5 (Colby *et al.* 1994).

3) *Mesure MALDI-TOF en mode réflecteur*

L'ajout d'un miroir électrostatique (réflecteur) à l'extrémité du tube de vol a permis d'améliorer la résolution. Ce réflecteur est composé d'une série d'anneaux ou de grilles de potentiels croissants qui ralentissent puis repoussent les ions. Ainsi plus un ion est léger, plus il fait demi-tour rapidement et rejoint rapidement le détecteur ; ce qui a pour effet d'augmenter encore la différence de temps de vol entre deux ions de masses différentes et

accroît d'autant plus la précision de mesure. Inversement, si deux ions de masses égales ont un léger décalage d'énergie cinétique, le miroir les repousse avec la même efficacité et les refocalise (Mamyrin *et al.* 1973). Le mode réflecteur très résolutif ne peut cependant pas s'appliquer à des masses supérieures à 10000 Da.

IV. ANALYSE EN MODE MS-MS

A. Post source decay (PSD)

Les ions ayant accumulé une très forte énergie interne lors de l'ionisation laser peuvent se casser dans le tube de vol : on parle d'ions métastables. Malheureusement comme cette cassure a lieu dans une zone dépourvue de champ électrique, ils gardent la même vitesse que l'ion intact et sont détectés en même temps (Kaufmann *et al.* 1993). Pour les visualiser il faut absolument utiliser le réflecteur. Les ions sont alors repoussés et réaccélérés à une vitesse fonction de leur masse et les fragments atteindront le détecteur à des temps différents (Figure 26).

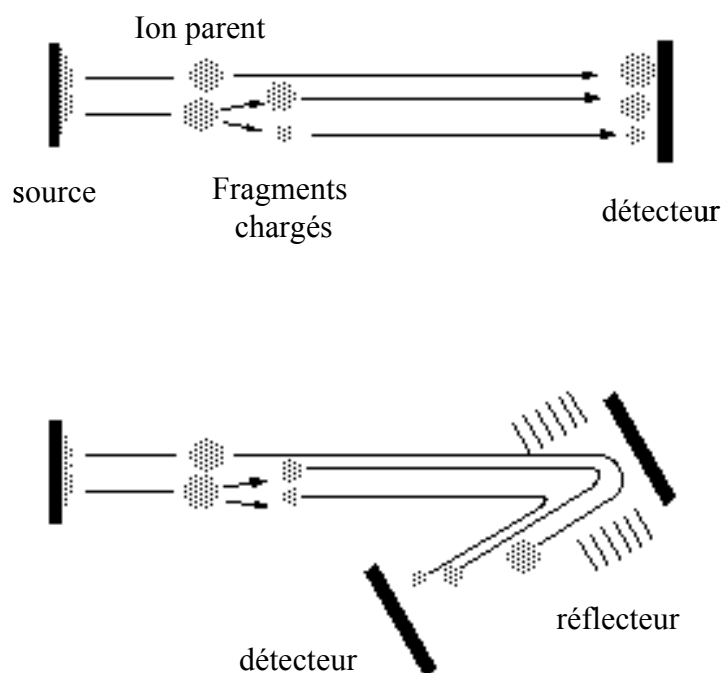


Figure 26. Principe du post source decay. Les fragmentations après la source ne sont visibles que si on utilise un réflecteur.

Pour détecter un maximum d'ions métastables il est nécessaire d'abaisser graduellement le potentiel du réflecteur. Cette méthode permet aux laboratoires non équipés de spectromètre de masse en tandem d'obtenir des informations de séquence mais reste

néanmoins fastidieuse et peu sensible comparée aux analyses dans les spectromètres en tandem.

B. In source decay (ISD)

Contrairement au «post source decay», lors de l'«ion source decay» (ISD) les ions sont cassés dès la source et subissent l'accélération d'un champ électrique qui discrimine les ions intacts (ions parents) et leurs fragments (ions fils) selon leur masse. Les ions fils seront détectés en mode linéaire ou réflecteur. L'ISD est d'autant plus probable que le délai d'extraction est long et favorise les collisions (Katta *et al.* 1998).

C. Analyseurs en tandem

Le Qstar (perseptive biosystems) utilisé au cours de ma thèse est de type triple quadripôle. Le premier et le troisième quadripôle servent d'analyseurs du rapport m/z alors que le deuxième quadripôle sert de chambre de collision des ions contre un gaz inerte (azote, hélium, argon). On parle de décomposition induite par collision (CID). Le triple quadripôle, par ses capacités d'analyse, permet trois types d'analyses :

En mode MS-MS classique : dans le premier quadripôle, on sélectionne un ion (ion parent) pour le faire pénétrer dans la chambre de collision qui casse ses liaisons les plus faibles. Le deuxième spectromètre mesure le rapport m/z des ions obtenus (ions fils). C'est le mode utilisé lors de ma thèse pour obtenir des informations de séquence sur les peptides à identifier.

En mode perte de neutre : le troisième quadripôle n'analyse que les ions qui perdent une masse déterminée par rapport à la masse de l'ion parent mesurée par le premier quadripôle (par exemple, 98 Da est la perte de neutre correspondant à une sérine ou une thréonine phosphorylée). Le quadripôle Q1 mesure la taille de l'ion parent, l'ordinateur en déduit une taille attendue si l'ion parent perdait la masse déterminée et Q3 détecte si à la taille attendue un ion est bien présent.

En mode recherche d'ions parents : permet de détecter les ions parents qui donnent après collision un ion fils d'une taille déterminée. Cela permet de détecter des modifications post-traductionnelles précises dans un mélange de peptides. Q3 est calé sur la masse du fragment recherché appelé ion signature tandis que Q1 mesure la taille de tous les ions parents (Huddleston *et al.* 1993) (par exemple 79 est la masse mesurée en mode négatif correspondant à une phosphorylation).

V. IDENTIFICATION DE PROTEINES PAR SPECTROMETRIE DE MASSE

A. Empreinte peptidique massique (mass fingerprint) : approche MS

Cette méthode d'identification des protéines est apparue comme une alternative au séquençage d'Edman (Henzel *et al.* 1993 ; James *et al.* 1993 ; Mann *et al.* 1993). Elle ne nécessite pas le séquençage de la protéine mais la mesure des masses des fragments de la protéine obtenus après digestion par une protéase à sites de digestion bien spécifiques ; par exemple, la trypsine qui coupe en C-terminal des arginines ou des lysines. C'est la confrontation de ces masses mesurées avec les masses calculées *in silico* à partir des banques de données qui permet l'identification de la protéine. Evidemment cette méthode n'est utilisable que si on dispose de données génomiques et/ou protéiques suffisantes pour l'organisme sur lequel on travaille. Dans le cas d'une approche hétérologue, le séquençage de la protéine est recommandé.

La fiabilité de l'identification par empreinte tryptique dépend de plusieurs paramètres :

- Taux de recouvrement de la protéine entière par les fragments peptidiques mesurés
- Nombre de peptides dont les masses mesurées ont « matché » avec les masses calculées
- Précision de mesure et homogénéité des décalages observés entre masse théorique et masse calculée. Dans le cas contraire, il faut vérifier l'étalonnage du spectre avant de conclure

A cela il faut ajouter plusieurs variables en fonction de la taille de la protéine : plus la masse est grande, plus on a de chance de trouver des peptides qui matchent par hasard, par contre, il faudra plus de match pour couvrir un bon pourcentage de la protéine. Les causes de non identification de la protéine par cette méthode peuvent être :

- Un faible pourcentage de recouvrement
- Une mesure peu précise ou une mauvaise calibration du spectre
- Un « écrasement » du signal d'intérêt par celui de la trypsine (il faut baisser sa quantité) ou des contaminants
- Une composition en acides aminés pauvre en Proline ou pauvre en Arginine ou Lysine C-terminales ; celles-ci améliorent leur ionisation/détection (Krause *et al.* 1999)

- Présence massive de modifications des peptides (modifications post-traductionnelles ou chimiques lors des manipulations) qui dispersent le signal
 - Présence de sites de coupure enzymatiques trop fréquents ou trop rares générant des fragments trop petits ou trop grands pour être détectés dans la plage de masses mesurées par l'appareil. Dans ce cas, il faut envisager d'utiliser une autre protéase.
- En absence de résultat, il faut utiliser l'approche MS-MS.

B. Informations de séquence : approche MS-MS

La spectrométrie de masse en tandem permet d'obtenir des informations de séquence (et non la séquence) sur les peptides qui, dans la chambre de collision, cassent au niveau de la liaison peptidique ou de part et d'autre. En fonction de la liaison cassée, une nomenclature internationale (Figure 27) a été mise au point pour les différents types d'ions fils obtenus après fragmentation d'un peptide ion parent (Roepstorff and Fohlman 1984 ; Biemann 1990). En fragmentation de basse énergie on voit apparaître les ions suivants ::

- **Ions a, b et c** : la charge positive est portée par l'acide aminé N-terminal
 - **Ions a** : cassure en amont de la liaison peptidique CH-CO
 - **Ions b** : cassure de la liaison peptidique CO-NH
 - **Ions c** : cassure en aval de la liaison peptidique NH-CH
- **Ions x, y et z** : la charge positive est portée par l'acide aminé C-terminal
 - **Ions x** : cassure en amont de la liaison peptidique CH-CO
 - **Ions y** : cassure de la liaison peptidique CO-CN
 - **Ions z** : cassure en aval de la liaison peptidique NH-CH

Si on fragmente en haute énergie on peut aussi voir apparaître les ions suivants :

- **Ions d** : la charge positive est portée par l'acide aminé N-terminal
 - cassure de la chaîne latérale après le carbone bêta
- **Ions v et w** : la charge positive est portée par l'acide aminé C-terminal
 - **Ions v** : cassure de la chaîne latérale après le carbone alpha
 - **Ions w** : cassure de la chaîne latérale après le carbone bêta

Suivant la position de la cassure, l'ion est incrémenté d'un nombre qui correspond à la position de l'acide aminé correspondant dans la séquence peptidique. Après fragmentation on obtient donc les ions positivement chargés de la Figure 28.

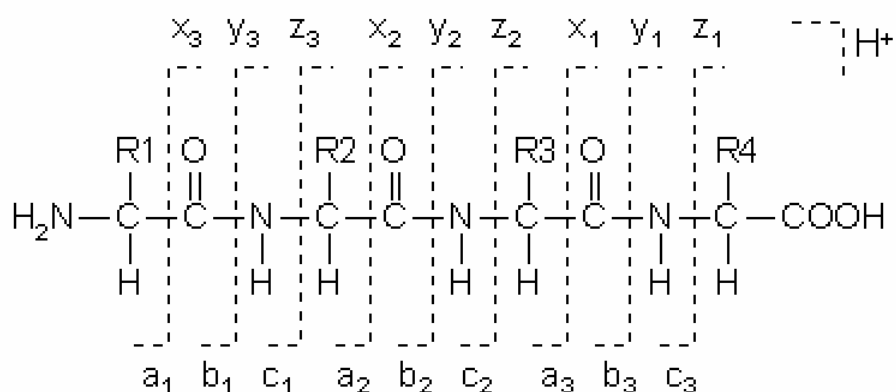


Figure 27. Nomenclature internationale des ions issus de la fragmentation de peptides

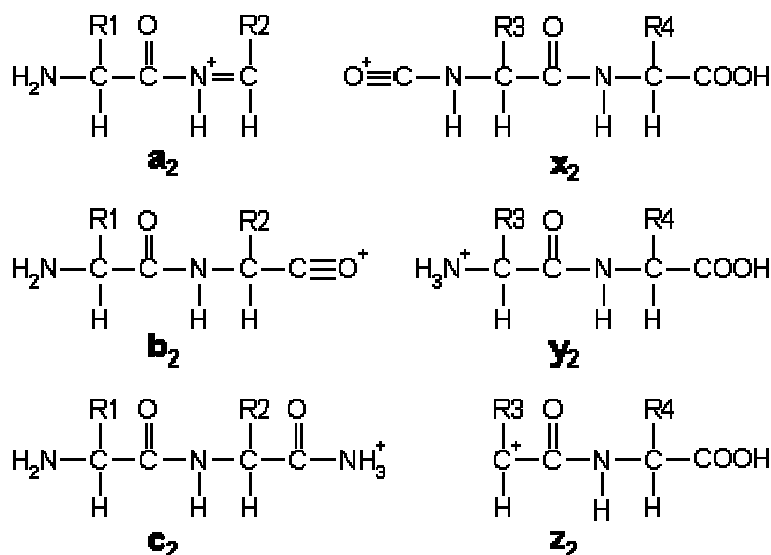


Figure 28. Formules semi-développées des ions issus de la fragmentation de peptides

Toutefois, les ions les plus visibles dans les spectres avec un triple quadripôle comme celui utilisé lors de ma thèse sont les ions b et y car la liaison peptidique est la plus fragile (Figure 29).

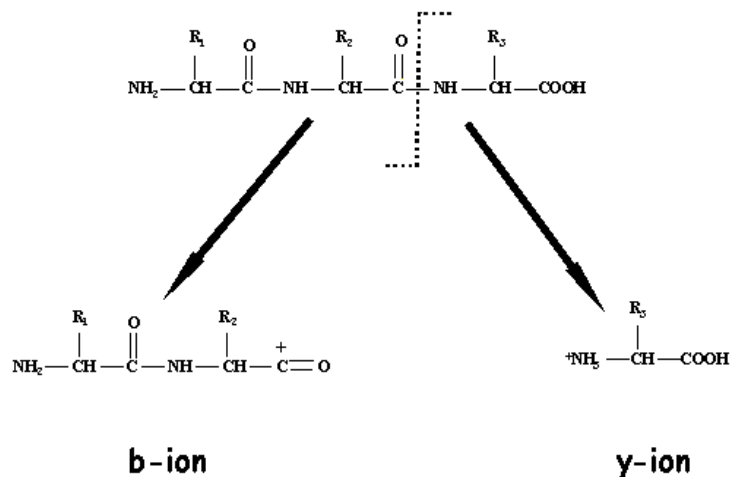


Figure 29. Fragmentation des peptides la plus fréquemment observée par collision sur Qstar

Si on regarde les ions d'une même série (b ou y), la différence de masse entre deux pics consécutifs correspond au résidu d'acide aminé perdu. Comme on connaît la masse précise des 20 acides aminés il est possible en progressant de proche en proche de retrouver des informations de séquence (Figure 30).

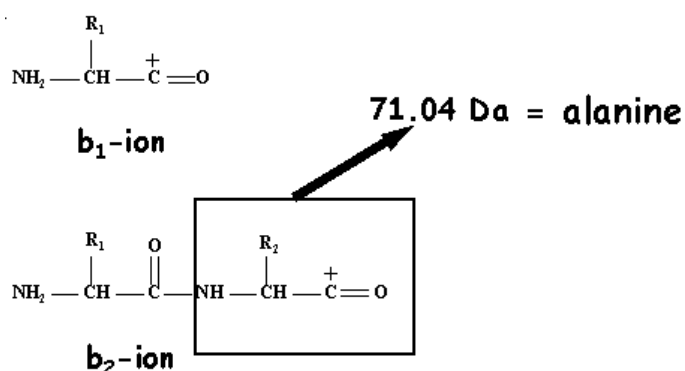


Figure 30. Obtention des informations de séquence à partir d'un spectre MS-MS

A noter que la séquence peptidique se lit des plus basses aux plus hautes masses pour les ions b et dans le sens inverse pour les ions y. Suivant la qualité des résultats obtenus, on peut obtenir deux types d'informations de séquence. Comme à l'information de séquence est ajoutée la taille du précurseur (ion parent), il suffit parfois d'une petite séquence de 3 ou 4 acides aminés pour identifier une protéine (Mann *et al.* 1993). On parle alors de « Peptide sequence tag ». Cependant l'approche MSMS est assez puissante pour obtenir de longues informations de séquence et conforter d'autant plus l'identification de la protéine.

C. Interrogation des bases de données

Après traitement des spectres (lissage, filtre anti-bruit, déconvolution), on obtient des informations brutes (taille/intensité des pics) ou un « mass fingerprint » ou des informations de séquence (tag ou sequence). Le type d'interface permettant d'interroger les bases de données diffère suivant le type d'informations utilisées. Une majorité de ces interfaces est disponible en ligne. Elles ont leurs propres paramètres pour hiérarchiser les résultats (précision de mesure, nombre de peptides matchés, couverture de séquence) :

- **Mascot** (<http://www.matrixscience.com>)
- **MS-Fit** (<http://prospector.ucsf.edu/ucsfhtml4.0/msfit.htm>) (mass fingerprint)
- **Profound** (mass fingerprint)
- **Peptide Search** ([http://www.narrador.embl-heidelberg.de/GroupPages/PageLink/peptide searchpage.html](http://www.narrador.embl-heidelberg.de/GroupPages/PageLink/peptide%20searchpage.html)) (mass fingerprint)
- **Peptide mass** (<http://www.expasy.org/tools/peptide-mass.html>)
- **Aldente** (<http://www.expasy.org/tools/aldente/>) (mass fingerprint)

Toutes sortes d'outils pour valider les résultats ou simuler des modifications des protéines sont disponibles sur des serveurs tels que :

- **Swissprot** (<http://www.expasy.org/tools>)
- **Proteinprospector** (<http://prospector.ucsf.edu>)

Il est également possible d'aligner les séquences obtenues contre celles disponibles les bases de données avec des outils tels que Blast ou Fasta3 (Expasy).

Ces outils de spectrométrie de masse nous ont permis de mettre un nom sur les protéines co-immunoprécipitées avec Akt, de « pêcher » des candidats-partenaires. Ces protéines étaient potentiellement des partenaires totalement méconnus de la kinase Akt, nous sommes ensuite revenus à des outils de biologie plus classiques pour les valider et comprendre leur importance dans la signalisation de Akt et dans le cancer du sein.

RESULTATS

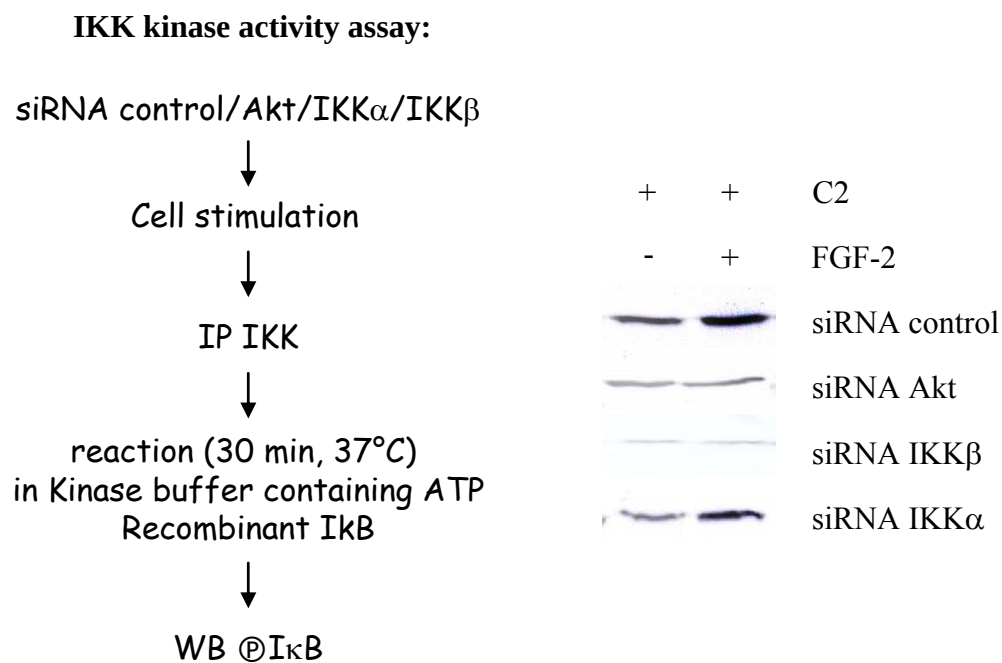
***ARTICLE 1 : THE ANTI-APOPTOTIC EFFECT OF
FIBROBLAST GROWTH FACTOR-2 IS MEDIATED
THROUGH NUCLEAR FACTOR-KB ACTIVATION
INDUCED VIA INTERACTION BETWEEN AKT AND IKK
KINASE-B IN BREAST CANCER CELLS***

***ARTICLE 3: PROTEOMIC EXPLORATION REVEALS
ACTIN AS A MAJOR SIGNALING PARTNER OF THE
SERINE/THREONINE KINASE AKT***

Sera soumis à «Molecular and Cellular Proteomics» en septembre 2005

Données supplémentaires

Nous avons également réalisé un test d'activité kinase du complexe IKK lors de la stimulation par le FGF-2 et ce en éteignant par siRNA l'expression de Akt, de IKK α ou de IKK β . Nos résultats ont montré que Akt est nécessaire à la stimulation de l'activité du complexe et que IKK β est absolument indispensable à l'activité du complexe IKK. Par contre, le siRNA quasi total de IKK α n'abolit que faiblement l'activation du complexe. IKK β est donc nécessaire et suffisant pour une stimulation de l'activité IKK via la voie Akt.



ARTICLE 2 : THE VALOSIN-CONTAINING PROTEIN (VCP) IS A TARGET OF AKT SIGNALING REQUIRED FOR CELL SURVIVAL

En révision pour «Journal of Biological Chemistry»

VCP (valosin-containing protein) est une protéine de la famille des AAA ATPases (ATPases associated with a variety of cellular activities). Comme son nom l'indique cette famille contrôle une très large palette de phénomènes cellulaires tels que la reformation des membranes golgiennes et nucléaires après mitose (Meyer 2005), le transport vésiculaire, l'élimination de protéines solubles via le système ubiquitine-protéasome, la régulation génique, du cycle cellulaire et de l'apoptose (Woodman 2003). Nous avons pu identifier VCP dans le co-immuprécipitat de Akt. Devant le différentiel observé lors de la stimulation des cellules par le FGF-2 (tout ou rien) et la détection d'un consensus de phosphorylation par Akt, nous avons choisi VCP comme l'une des priorités dans notre étude des partenaires de Akt.

Données supplémentaires

Nous avons également séparé Akt et les protéines co-immunoprécipitées par électrophorèse 2D selon le protocole précédemment utilisé dans l'article 1 et décrit dans (Vercoutter-Edouart *et al.* 2001). L'analyse des spots protéiques par empreinte tryptique et les informations de séquence nous a permis d'identifier quelques candidats-partenaires de Akt qui sont essentiellement des protéines chaperones. Les noms des protéines identifiées sont remplacés sur le gel 2D correspondant à une condition où Akt a été stimulée par le FGF-2 (Figure 31).

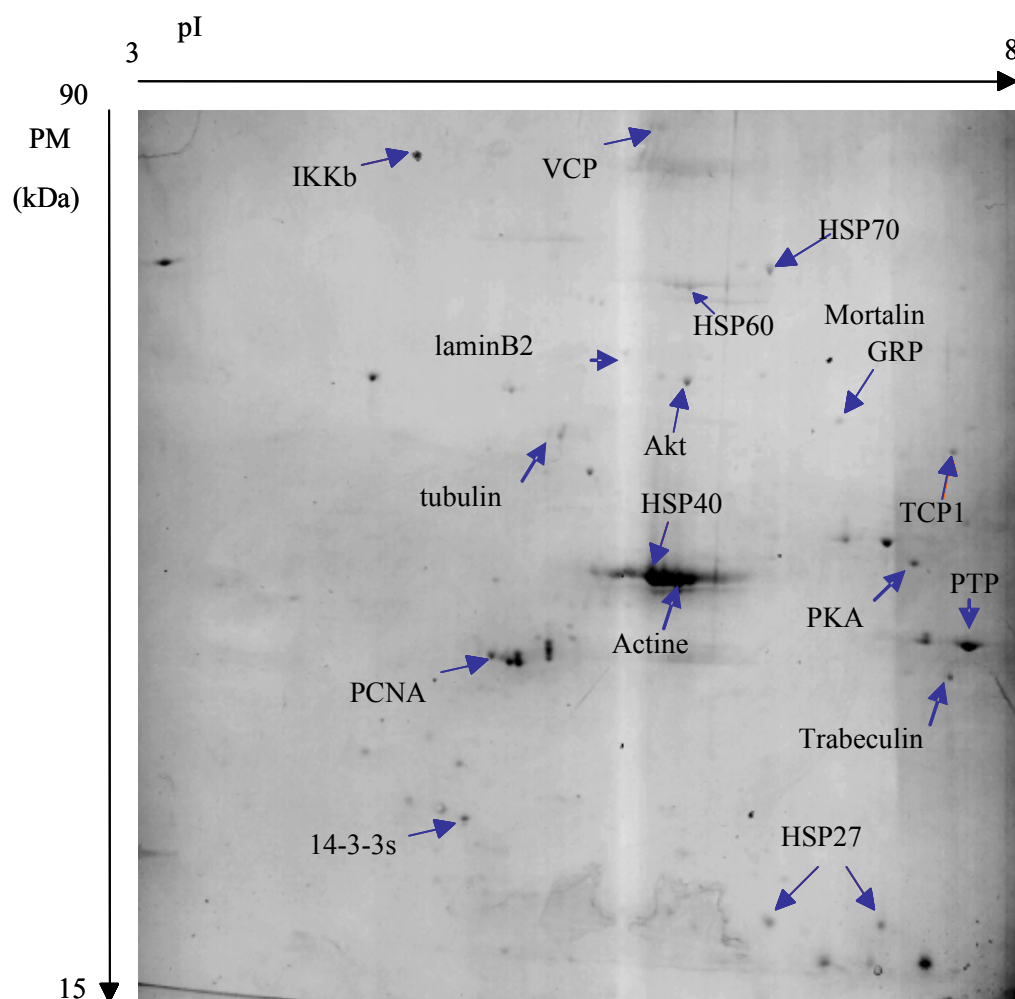


Figure 31. Gel 2D de séparation de Akt et de ses partenaires. Le gel présenté correspond à la coloration au bleu colloïdal de la séparation en électrophorèse 2D du co-immunoprécipitat de Akt après de la stimulation de Akt par le FGF-2.

DISCUSSION

Les travaux réalisés au cours de cette thèse ont permis d'identifier 3 nouveaux substrats de Akt, ou du moins de cette voie de signalisation, impliqués dans l'effet de survie du FGF-2. Les autres partenaires de Akt identifiés restent à être étudiés sur le plan fonctionnel.

Le FGF-2 favorise la résistance à l'apoptose des cellules de cancer du sein grâce à Akt

Nous avons montré dans l'article 1 que le FGF-2 est anti-apoptotique pour les cellules de cancer du sein. Les cellules MCF-7 que nous avons utilisées dans notre étude ont la particularité d'être déficientes en caspase 3, une caspase effectrice dans l'induction de l'apoptose, ce qui les rend moins sensibles à l'apoptose par radiation (Essmann *et al.* 2004). La déficience en caspase 3 semble être suppléée par la redondance d'effet entre les caspases et la caspase 3 constituerait une boucle d'amplification de l'effet des caspases dans l'induction de l'apoptose, observable en réexprimant la caspase 3 dans les MCF-7 (Yang *et al.* 2005). Une sensibilité moindre ne nous a cependant pas empêché d'induire l'apoptose des cellules MCF-7 avec les apoptogènes C2, 5FU, camptothécine et étoposide à un niveau suffisant pour notre étude. On peut ainsi considérer que les cellules MCF-7 constituent un modèle de cellules résistantes et l'étude des mécanismes par lesquels elles échappent aux traitements, notamment en réponse aux facteurs de croissance, permettrait d'élaborer de nouvelles stratégies pour les détruire. Nous avons tout de même testé l'effet du FGF-2 sur l'apoptose de trois lignées épithéliales mammaires différentes (MCF-7, BT-20, T47-D) afin de vérifier que l'effet anti-apoptotique du FGF-2 que nous avons mis en évidence n'était pas une particularité du modèle que sont les cellules MCF-7. Le FGF-2 ne sauvegarde pas seulement les cellules de cancer du sein de l'apoptose induite par le C2 céramide apoptogène mais aussi de l'apoptose induite par des drogues anti-cancéreuses utilisées en clinique : le 5-fluorouracile, la camptothécine ou l'étoposide. Ces apoptogènes induisent l'apoptose par des mécanismes différents (inhibition de la synthèse d'ADN, des topoisomérase 1 ou 2). Le FGF-2 a donc un effet global de résistance à l'apoptose. Cette action anti-apoptotique du FGF-2 a déjà été décrite pour d'autres types de cancers que le carcinome mammaire (Ornitz et Itoh 2001) et constitue un stimulateur fort de la survie des cellules de foie (Pardo *et al.* 2002), de prostate (Polnaszek *et al.* 2003) et des lymphocytes T (Murphy *et al.* 2001). Dans le cancer du sein, à part une étude indiquant que le FGF-2 inhibe la croissance et induit l'apoptose des cellules de cancer du sein dans des conditions expérimentales particulières (Fenig *et al.* 1997), toutes les études montrent une forte stimulation de la croissance tumorale et de la métastase (Kurebayashi *et al.* 1993; McLeskey *et al.* 1998; Rahmoune *et al.* 1998; Zhang *et al.* 1999;

Nurcombe *et al.* 2000; Suyama *et al.* 2002). Nos résultats confortent l'idée d'une stimulation de la croissance tumorale par stimulation directe de la prolifération mais aussi de la survie cellulaire. Compte tenu du fait que le FGF-2 est naturellement présent dans les tumeurs mammaires (Dickson *et al.* 2000) et est produit par les cellules mammaires (el Yazidi et Boilly-Marer 1995), nos résultats suggèrent que le FGF-2 endogène des tumeurs mammaires pourrait gêner l'action des thérapies anti-cancéreuses basées sur l'induction l'apoptose. C'est pourquoi des stratégies d'inhibition du FGF à base de glycosaminoglycannes ou d'inhibiteurs de tyrosine kinase (Ornitz et Itoh 2001; Manetti et Botta 2003) est une option à prendre en compte dans le traitement du cancer du sein.

Akt est hyperactivable en situation de stress dans les cellules de cancer du sein

Nous avons reporté dans l'article 1 que Akt est activé par le FGF-2 essentiellement en situation de stress. En effet (figure 2E article 1), Akt ne semble activé par le FGF-2 qu'en condition de traitement apoptogène par le céramide C2, le 5 fluorouracil, la camptothécine ou l'étoposide. Nous avons remarqué que le niveau d'expression de la protéine régulatrice p85 de la PI3K ne varie pas suivant le stress de la cellule alors que le niveau d'expression de la protéine PDK1, qui est un activateur direct de Akt, augmente en fonction du stress apoptogène. On peut même remarquer que le niveau d'activation de Akt par le FGF-2 suit le niveau d'expression de PDK1. Notre hypothèse est que le niveau de PDK1 dans les cellules MCF-7 est limitant pour l'activation de Akt et que ce niveau de PDK1 est augmenté en réponse au stress de la cellule ; augmentation qui permet alors une activation maximale de Akt, voie de résistance à l'apoptose par excellence. Comme la colocalisation de Akt et PDK1 n'est possible que grâce aux phosphoinositides PIP3 produits par la PI3K, on n'observe pas d'activation de Akt en stress seul mais lors de la stimulation de PI3K par le FGF-2. Cette surexpression de PDK1 par la cellule de cancer du sein lors du stress apoptogène apparaît donc comme un mécanisme permettant d'hyperactiver la voie Akt et d'échapper à l'apoptose.

Avantages et limites de notre approche expérimentale

Afin de pouvoir diminuer, voire inhiber l'effet de survie du FGF-2, il faut en connaître le mode de signalisation. L'étude des voies de signalisation empruntées dans nos conditions expérimentales, nous a permis d'identifier Akt comme le médiateur de la survie cellulaire. Afin de décrypter cette voie de signalisation, nous avons co-immunoprécipité Akt avec ses partenaires afin de les identifier grâce aux outils de la spectrométrie de masse.

L'immunoprécipitation a été faite sur protéine endogène, autrement dit sans transfection d'un vecteur codant la protéine d'intérêt. Travailler avec la protéine à des taux physiologiques évite les localisations atypiques fréquemment décrites pour les protéines surexprimées. Cela a nécessité de cultiver des quantités non négligeables de cellules (60 millions de cellules MCF-7 par condition) afin d'obtenir, après immunoprécipitation, des quantités de protéines compatibles avec la coloration des gels et l'identification par spectrométrie de masse. Cependant, l'un des problèmes rencontrés lors de l'utilisation d'une telle quantité de protéines est l'apparition de faux positifs, de protéines dites « collantes » que l'on va enrichir en même temps que les complexes de Akt. C'est pourquoi, après avoir identifié les protéines de l'immunoprécipitat, nous avons criblé la présence de sérines ou de thréonines phosphorylées par Akt grâce l'anticorps PAS et choisi d'étudier en priorité les protéines dont la co-immunoprécipitation avec Akt et la phosphorylation varie entre les conditions de culture où Akt est stimulée ou non par le facteur de croissance. Les autres partenaires de Akt dits constitutifs pourraient être nécessaires à sa conformation, à la présentation de substrats ou à la localisation de Akt mais des études complémentaires sont nécessaires pour identifier les faux positifs et répondre à cette question.

Des mises au point ont donc été nécessaires pour obtenir les immunoprécipitats les plus « propres » possibles. Cela a commencé par le test des différents supports d'immunoprécipitation (colonne/billes d'agarose, de sépharose/billes magnétiques) puis par l'accrochage covalent des anticorps sur des billes pour éviter d'en retrouver en quantités importantes dans les immunoprécipitats. Ceci est une limite non négligeable de l'immunoprécipitation en particulier lorsqu'elle est suivie d'une électrophorèse 2D car les chaînes lourdes et légères des anticorps font apparaître de longs trainées de spots qui masquent les signaux d'intérêt. La dernière mise au point s'est faite sur les méthodes d'élution des complexes protéiques à partir de billes (tampon Laemlli, baisse de pH). Le rendement d'élution par diminution de pH est moins bon mais on récupère moins de chaînes d'immunoglobulines. Par contre, l'élution par chauffage (95°C, 5 min.) est plus efficace mais relargue des chaînes d'immunoglobulines

Avec plus de recul sur les résultats obtenus au cours de cette thèse, de meilleurs rendements auraient peut-être été obtenus en surexprimant une protéine étiquetée de façon à utiliser un anticorps très efficace en immunoprécipitation. Une telle approche a déjà été utilisée avec succès par Soskic pour identifier les partenaires du récepteur au PDGF (Soskic *et al.* 1999). Il aurait fallu valider ensuite les partenaires identifiés à des taux physiologiques pour vérifier que l'interaction n'est pas un artefact dû à la transfection. Récemment, une

méthode de double purification dite TAP (tandem affinity purification) pour purification poussée des complexes de protéines. La combinaison de deux étiquettes d'affinité différentes a considérablement réduit le nombre de faux-positifs. Quand nous avons démarré notre projet d'étude de signalisation de Akt, cette méthode TAP n'était pas encore publiée et réservée à l'étude de complexes constitutifs en levure (Rigaut *et al.* 1999) mais le transfert du système en cellules de mammifères et les résultats dans l'étude de la signalisation du TNF- α sont très prometteurs (Puig *et al.* 2001).

Mis à part IKK β , nous n'avons identifié que peu de protéines de signalisation ou de faible expression. Par ailleurs, nous n'avons pas confirmé les partenaires de Akt déjà identifiés. En électrophorèse 2D (Figure 31), cette non-détection peut s'expliquer par l'hydrophobicité et les points isoélectriques fortement basiques des partenaires les plus connus de Akt. Par exemple, GSK-3 a un point isoélectrique théorique de 9 et la télomérase humaine a un point isoélectrique de 10,72 pour une masse moléculaire de 120 kDa ; ce qui les rend difficilement détectable en électrophorèse 2D. Cependant nous ne sommes pas parvenus non plus à les détecter en SDS-PAGE. Etaient-ils masqués par les protéines majoritaires ? N'étaient-ils pas suffisamment purifiés par notre méthode ?

Actuellement, il existe plusieurs alternatives aux gels d'acrylamide. En effet, les progrès de ces dernières années en chromatographie liquide (multi-dimensionnelle, femtodébit) et la sensibilité toujours plus grande des spectromètres de masse ainsi que les nouvelles approches de type « shotgun » (Li *et al.* 2003; McDonald et Yates 2003) devraient permettre de détecter les protéines basiques et légèrement hydrophobes dont font partie nombre de partenaires de Akt.

La co-immunoprécipitation permet de purifier des complexes protéiques et ceux-ci se composent parfois d'un grand nombre de protéines. Si la force des interactions protéine-protéine le permet, l'anticorps peut entraîner une chaîne de plusieurs protéines qui résiste aux rinçages de l'immunoprécipitation et nous obtenons ainsi des partenaires indirects de Akt. Ils ne sont évidemment pas des substrats de Akt et leur co-immunoprécipitation dépend de celle du partenaire direct de Akt qui a servi d'intermédiaire. Nous avons identifié l'alpha actinine-4 ou PCNA comme partenaires indirects de Akt. Notre étude ayant été centrée sur une recherche des cibles de signalisation de Akt, nous nous sommes concentrés sur les protéines dont l'interaction avec Akt est régulée par le FGF-2 et qui sont phosphorylées sur un consensus correspondant à celui de Akt.

Pertinence des candidats partenaires identifiés

Les protéines identifiées, qui ont été retenues dans le co-immunoprécipitat, ne comportent pas toutes le consensus de phosphorylation par Akt RXXXXS/T déduit d'une série d'études *in vitro*. Plusieurs hypothèses s'offrent à nous : les protéines retenues ne sont pas des substrats mais des co-facteurs de Akt, sont des partenaires indirects de Akt, ou sont des faux positifs dûs aux limites de spécificité des anticorps et de celle de l'immunoprécipitation (compromis lavage / signal). L'immunoprécipitation reverse (immunoprécipitation du candidat-partenaire) et l'identification de Akt dans l'immunoprécipitat nous a permis d'écarter les faux positifs.

Il est à noter que certaines protéines, comme des substrats reconnus de Akt *in vivo*, ne ressortent pourtant qu'avec des paramètres de stringence faible quand on les crible avec les algorithmes de Scansite (<http://scansite.mit.edu/motifscanner/motifscan1.phtml>); ce qui montre une limite de l'approche bioinformatique basée sur des peptides de synthèse seuls et non validés dans un contexte biologique.

Quasiment tous les substrats de Akt démontrés à ce jour présentent le consensus RXaaRXaaXaaS/T. Toutefois, dans un contexte *in vivo*, il s'avère que l'arginine en position -5 du site S/T de phosphorylation par Akt ne soit pas absolument indispensable. En effet, l'« Insulin-response Element-binding Protein 1 » (KERCQS**1036**) (Villafuerte *et al.* 2004), la « Yes-Associated Protein » (Basu *et al.* 2003), CREB LSRRPS**133**Y (Du et Montminy 1998), et l'ATP-citrate Lyase (TPAPSRTASF) (Berwick *et al.* 2002) sont phosphorylés *in vivo* par Akt sans posséder cette Arginine en -5. Lawlor et collaborateurs ont supposé pour Akt l'existence d'un motif d'accrochage, fonctionnant comme le domaine δ de C-jun, qui stabiliserait *in vivo* l'interaction de Akt avec certains de ses substrats et qui seraient à l'origine des différences observées entre les résultats *in vivo* et *in vitro* (Lawlor et Alessi 2001).

Mdm2 est un autre exemple de substrat de Akt qui a pourtant un mauvais score *in silico*. Chez la souris, la sérine 185 de mdm2 obtient le meilleur score des candidats et est bien phosphorylé *in vivo et in vitro* par Akt. Par contre, le mdm2 humain possède un acide aspartique en +1 qui rend son score très mauvais. Et pourtant, mdm2 humain est fortement phosphorylé *in vivo* par Akt. L'approche *in silico* est un bon outil pour trier les candidats-substrats et évaluer une priorité dans leur étude s'ils sont nombreux, mais certaines cibles atypiques de Akt ne sont pas détectées par cette méthode et il est toujours indispensable de tester l'éventuelle phosphorylation *in vivo*.

Rôle potentiel des candidats-partenaires identifiés

Nombre des protéines que nous avons identifiées dans le co-immunoprécipitat de Akt se sont révélées être des protéines chaperones. La protéine 14-3-3 σ , ou stratifine, est une chaperone se fixant à des protéines sur des sites phosphorylés pour réguler leur activité ; d'où son importance dans les voies de signalisation (Mackintosh 2004). Pour cause d'hyperméthylation du promoteur du gène, 14-3-3 σ est fortement sous exprimée dans les biopsies de cancer du sein et dans les lignées mammaires (Ferguson *et al.* 2000 ; Vercoutter-Edouart *et al.* 2001). Pourtant nous la retrouvons dans l'immunoprécipitat de Akt à un niveau détectable par la coloration au bleu colloïdal. L'interaction de Akt avec 14-3-3 σ doit être assez forte pour permettre d'enrichir l'extrait en protéine 14-3-3 σ . L'expression de 14-3-3 σ est induite en réponse au stress et provoque un arrêt du cycle cellulaire en G2. Ces données amènent l'idée d'un rôle suppresseur de tumeur pour 14-3-3 σ . De façon intéressante, il a été montré que 14-3-3 σ peut être un régulateur négatif de la voie Akt en piégeant les sites de phosphorylation des substrats de Akt bloquant ainsi leur activité. Comme c'est le cas de la tubérine (Liu *et al.* 2002). Il y aurait donc une balance entre Akt et 14-3-3 σ de part leurs pouvoirs respectivement oncogénique et répresseur et de part le pouvoir de régulation négative de 14-3-3 σ sur la signalisation de Akt. D'autres protéines chaperones ont aussi été identifiées dans le co-immunoprécipitat de Akt telles que la HSP27 ou la mortaline dont le rôle principal est également de protéger les protéines de la dégradation et de la déphosphorylation et de stabiliser les complexes protéiques.

- **Régulation de l'effet de survie de NF κ B par Akt**

La signalisation antiapoptotique des facteurs de croissance implique souvent les voies de signalisation NF κ B (Karin *et al.* 2004) et MAPK (Ballif et Blenis 2001). L'activité NF κ B est contrôlée par la translocation du cytoplasme au noyau de dimères de facteurs de transcription NF κ B retenus dans le cytoplasme par les inhibiteurs kappa B (I κ B). I κ B masque leur séquence de localisation nucléaire (NLS, nuclear localization sequence), leur site de dimérisation et leur site de liaison à l'ADN. Après stimulation, I κ B est phosphorylé par le complexe des I κ B kinases (IKKs) induisant une dégradation rapide de I κ B par le système ubiquitine protéasome 26S et ainsi une translocation nucléaire des dimères de NF κ B qui stimulent alors l'expression de leurs gènes cibles (Karin *et al.* 2004). Le complexe des IKKs est composé de deux sous-unités catalytiques IKK α et IKK β et d'une sous-unité régulatrice IKK γ (NEMO). IKK β est la sous-unité primordiale pour l'activation de la voie canonique de

NFκB qui dépend de la dégradation de IκB et qui est décrite comme activant directement p65 par phosphorylation. IKKα est la sous-unité primordiale pour la voie NFκB non canonique qui régule au moins les dimères Rel B/p52 (Karin *et al.* 2004).

La voie PI3K/Akt est un régulateur de la survie cellulaire par activation indirecte du facteur de transcription NFκB lors de la stimulation par les facteurs de croissance tels que le TNF (Ozes *et al.* 1999) ou le PDGF (Romashkova et Makarov 1999). Dans ces cas, c'est la phosphorylation de la forme alpha de IKK sur la thréonine 23 à qui a été imputé le lien entre Akt et NFκB. Dans l'article 1 nous montrons que l'interaction entre Akt et IKKβ est augmentée lors de la stimulation par les facteurs de croissance et qu'il en résulte une phosphorylation de IKKβ sur un consensus proche de celui reconnu par Akt. De plus, l'expérience d'ARN interférence sur les IKK α et β a montré que IKKβ seul peut être stimulé par Akt. Akt serait donc capable d'activer, par phosphorylation, à la fois les formes α et β de IKK pour stimuler l'activité globale du complexe IKK et activer la voie NFκB. Il est également observé lors de la stimulation de monocytes/macrophages par des lipopolysaccharides (LPS) que IKKβ peut directement phosphoryler sur la sérine 536 le facteur de transcription p65 de la famille NFκB pour le libérer de IκB (Yang *et al.* 2003). Nous avons démontré que la phosphorylation de IKKβ correspond à une augmentation de l'activité NFκB mais on ne sait pas si dans ce cas IKKβ phosphoryle IκB et/ou p65 pour activer NFκB.

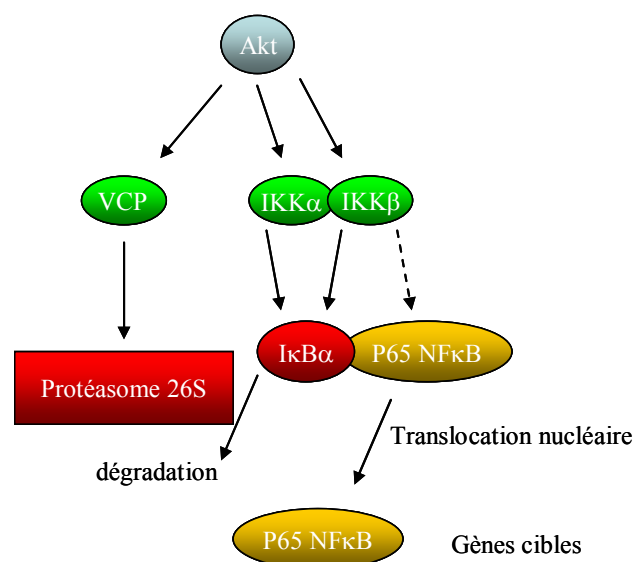


Figure 32. Schéma hypothétique d'action d'Akt sur la voie NFκB (VCP, valosin-containing protein ; IKK, inhibitor kappaB kinase ; IκB, inhibitor kappaB ; NFκB, nuclear factor kappaB)

Dans l'article 2, nous avons démontré que Akt est capable de phosphoryler la valosin-containing protein (VCP) sur un consensus proche de celui de Akt et que VCP est nécessaire à l'activation de NF κ B par Akt. Un lien est déjà connu entre VCP et NF κ B puisque VCP est une ATPase qui interagit directement avec I κ B et module sa dégradation par le protéasome 26S (Dai *et al.* 1998; Dai et Li 2001). Nous montrons pour la première fois que Akt est capable de réguler la voie NF κ B par un autre processus que la stimulation du complexe IKK.

La régulation de NF κ B par Akt apparaît donc bien plus complexe que la seule phosphorylation de IKK α (Figure 32).

- ***Le contrôle du cytosquelette : une fonction émergente de Akt***

Plusieurs partenaires de Akt identifiés au cours de notre étude sont des composants du cytosquelette et d'autres données récentes de la littérature indiquent que le contrôle du cytosquelette est une fonction émergente d'Akt (Lee *et al.* 2001). Les tubulines, constituants des microtubules, sont des hétérodimères de formes α et β . Leurs modifications post-traductionnelles jouent un grand rôle dans l'apoptose et la résistance des cellules cancéreuses aux thérapies. La modification des tubulines a été reportée dans le cancer du sein comme étant corrélée avec une forte agressivité de la tumeur (Mialhe *et al.* 2001). De même, un nombre important de modifications des tubulines a été détecté dans des clones de cellules MCF-7 résistantes au taxol (Banerjee 2002) et l'interaction des tubulines et du taxol est maintenant bien caractérisée (Snyder *et al.* 2001). Plusieurs kinases telles que MEK, ERK et p90RSK interagissent avec les tubulines pour réorganiser le cytosquelette et réguler la division cellulaire (Willard et Crouch 2001). Nos résultats montrent que Akt est également une kinase interagissant avec les tubulines. Comme l'activité de Akt provoque la résistance des cellules de cancer du sein aux traitements anticancéreux dont le taxol (Clark *et al.* 2002), un lien entre activité de Akt et tubulines est possible. Les tubulines sont-elles une cible de la signalisation de Akt ? Sont-elles importantes pour l'activité de cette kinase ?

Nous avons identifié un autre partenaire de Akt faisant partie du cytosquelette : l'alpha-actinine 4 qui est une forme non musculaire de l'alpha actinine dont la surexpression augmente sensiblement la mobilité cellulaire. Il a déjà été décrit une relation entre la voie PI3K/Akt et l'alpha-actinine 4 puisque l'inhibition de la PI3K provoque une relocalisation de l'alpha actinine 4 du noyau dans le cytoplasme et coïncide avec un remaniement de l'actine (Honda *et al.* 1998). La relocalisation de l'alpha-actinine 4 est fortement corrélée avec un phénotype histologique infiltrant et un mauvais pronostic dans le cancer du sein. Ces données suggèrent que l'alpha-actinine-4 cytoplasmique augmente la mobilité cellulaire. Nous n'avons

pas pu mettre en évidence de site phosphorylé par Akt sur l'alpha-actinine 4, Akt ne doit donc pas réguler directement la localisation de l'alpha-actinine 4 par phosphorylation. Néanmoins, l'alpha-actine-4 est également décrite comme une protéine servant de ponts entre enzyme et substrat. De cette façon, elle pourrait agir comme un cofacteur de Akt stabilisant son interaction avec ses substrats. Son interaction avec Akt peut aussi être indirecte et on peut co-immunoprécipiter Akt et l'alpha-actine 4 via l'un des partenaires directs de Akt. Le candidat le plus probable pour servir d'intermédiaire entre Akt et l'alpha-actinine-4 semble être l'actine puisqu'elle co-immunoprécipite avec Akt et puisque actine et alpha-actinine sont souvent fortement liées (Lebart *et al.* 1993). Cependant, la possibilité d'une interaction directe de Akt et de l'alpha-actinine-4 sans phosphorylation de l'actinine ne peut pas être écartée.

L'actine est la protéine du cytosquelette que nous avons identifiée comme partenaire majeur de Akt. Nous avons également démontré qu'elle est phosphorylée sur un consensus lors de la stimulation par le FGF-2 et cette phosphorylation corrèle avec un remaniement cortical de l'actine. Nous avons montré que Akt seul est capable de phosphoryler *in vitro* l'actine sur un tel consensus. Le réseau d'actine est un système structurellement et fonctionnellement complexe retrouvé dans toute cellule eucaryote (Carlier 1991). Sa régulation joue un rôle crucial dans la croissance, la différenciation, l'exocytose et la mobilité cellulaire. Lors du développement tumoral et de la métastase, un remaniement de l'actine est souvent la conséquence de signaux oncogénique tels que Src ou Ras ou à l'inactivation de protéines liées à l'actine qui ont un rôle de suppresseurs de tumeur comme la gelsoline (Yin et Stull 1999). De façon intéressante, la PI3K est nécessaire pour la nucléation de l'actine provoquée par la stimulation de cellules de cancer du sein par l'EGF (Hill *et al.* 2000). Nos travaux suggèrent que Akt est un effecteur important de la PI3K dans le remaniement de l'actine.

Les petites protéines Rac, Rho et cdc42 contrôlent le cytosquelette d'actine et régulent aussi la synthèse des PIP2 par association avec les PI3K (Toker 1998). Ces actions des petites protéines G ne sont peut-être pas indépendants puisque les PIP2 sont justement les substrats de la PI3K qui lui permettent d'activer indirectement Akt, activation qui correspond au remaniement de l'actine. Les PIP2, en tant qu'élément du cycle des phosphoinositides, jouent aussi un rôle important dans la régulation de voies de signalisation, du remaniement du cytosquelette et du trafic intracellulaire (Toker 1998; Anderson *et al.* 1999).

D'autres membres de la voie PI3K ont également été décrits comme provoquant un remaniement de l'actine. La famille des kinases activées par p21 (PAK, p21-activated kinases) phosphorylent également l'actine sous la dépendance des petits protéines G. Rac

elles même activées par la PI3K désassemble les fibres de stress et redistribue les microfilaments via cdc42 (Papakonstanti et Stournaras 2002). PAK1 peut également être activée par Akt (Saltiel et Kahn 2001) ou PDK1 indépendamment de la PI3K ou des GTPases. (King *et al.* 2000). De la même façon, la phosphorylation de EDG1 (endothelial differentiation gene 1) par Akt régule l'activation de Rac, un remaniement cortical de l'actine et la migration chémo-sensible. La phosphorylation de EDG1 par Akt constituerait un déclencheur de la migration cellulaire (Lee *et al.* 2001; Robert *et al.* 2001). Ces données montrent que Akt peut réguler indirectement le cytosquelette d'actine et favoriser la migration cellulaire. Mais cette régulation du cytosquelette peut-elle se faire par une action directe de Akt sur l'actine ?

Une interaction de Akt dépendante du domaine PH avec l'actine a déjà été démontrée mais aucune phosphorylation directe de l'actine par Akt n'avait été décrite (Cenni *et al.* 2003). Dans l'article 3, nous avons démontré que Akt phosphoryle directement l'actine de façon dépendante de son domaine PH sous la stimulation par le FGF-2 et que cela correspond à un remaniement cortical de l'actine. Cependant, à ce stade, nous ne savons pas si ce remaniement est dû à la phosphorylation de l'actine par Akt ou à l'action d'un effecteur de Akt comme EDG1 (Lee *et al.* 2001). De nombreux effecteurs de la voie PI3K/Akt régulent donc l'organisation de l'actine. Redondance d'effets ? Régulation fine du remaniement ? Des études seront nécessaires pour répondre à ces questions mais les données actuelles renforcent la conviction d'un rôle important de cette voie de signalisation dans les phénomènes liés au cytosquelette.

De précédentes études ont déjà montré, dans les cellules de cancer du sein, une hyperphosphorylation de l'actine qui se traduit par une hyperpolymérisation de l'actine, une augmentation de la mobilité cellulaire et une résistance au chimio et radiothérapies (Lim *et al.* 2004). Nos résultats montrent le réarrangement cortical de l'actine suite à la stimulation de Akt et une migration accrue des cellules. Cependant, pour l'effet de résistance aux traitements apoptogènes il est difficile de différencier l'effet de Akt sur l'actine de celui que Akt a sur ses autres cibles régulant l'apoptose. Il faudrait créer une actine mutée pour ses sites de phosphorylation par Akt mais il resterait alors les effets indirects de Akt via (par exemple EDG1) et il serait difficile de surexprimer un tel mutant face à la quantité déjà énorme d'actine endogène.

Nécessité de cartographier les sites de phosphorylation

Nous n'avons pas, pour l'instant, cartographié les sites de phosphorylation sur les nouveaux substrats de Akt que nous avons identifiés. Nous avons pu détecter la présence de ces sites grâce à l'anticorps PAS mais la mutagenèse dirigée de ces sites de phosphorylation permettrait de préciser lesquels sont réellement importants pour l'activité de Akt. Par IMAC, nous avons pu réaliser des enrichissements en peptides phosphorylés sur un standard de β caséine mais le passage à l'échantillon biologique est difficile du fait des faibles quantités récupérées. Lors de la stimulation des voies de signalisation, seulement un petit pourcentage de chaque substrat est phosphorylé. Actuellement nous essayons de produire, par traduction *in vitro*, la protéine VCP pour vérifier si la phosphorylation *in vitro* par Akt seul est possible ; si oui, nous réaliserons la cartographie des sites de phosphorylation. Parallèlement, nous essayons de surexprimer VCP dans les cellules MCF-7 afin de réaliser la même expérience en cellules intactes car des cofacteurs peuvent être nécessaires. Cette nécessité de cartographier les sites de phosphorylation dans les études de protéomique fonctionnelle sur les voies de signalisation a motivé mon choix de position post-doctorale dans l'unité de protéomique du Dr. Nicholas Morrice (Wellcome Trust Biocentre, MRC Unit, Dundee).

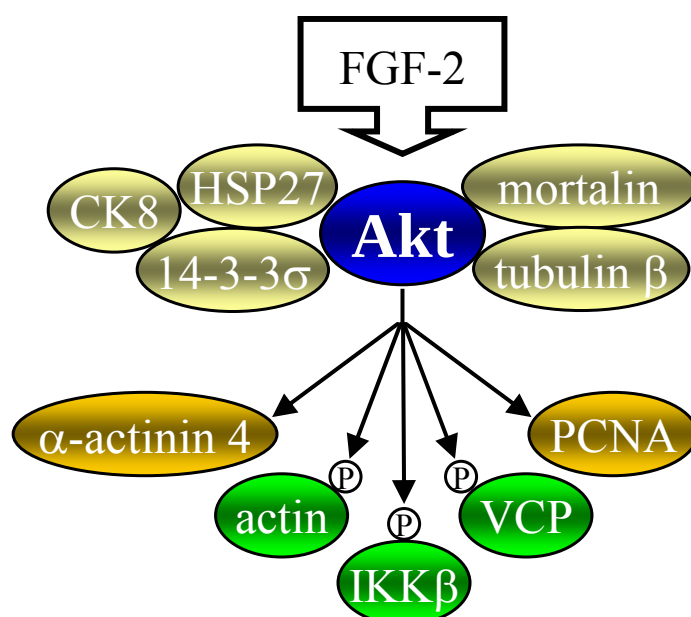


Figure 33. Schéma récapitulatifs des résultats obtenus. Les protéines en jaune ont été co-immunoprécipitées avec Akt sans variation lors l'activation de Akt. Les protéines orange sont différenciellement co-immunoprécipitées lors de la stimulation de Akt. Les protéines vertes sont des substrats de Akt (FGF, fibroblast growth factor; HSP, heat shock protein; CK, cytokératine; PCNA, proliferation cell nuclear antigen; VCP, valosin-containing protein; IKK, inhibitor kappaB kinase)

En conclusion, au cours de ce travail de thèse dont les résultats sont résumés dans la Figure 33, nous avons pu identifier une dizaine de candidats-partenaires de Akt mais surtout trois nouveaux substrats de la voie de signalisation de Akt. IKK β et VCP complètent la compréhension de l'activation de NF κ B par Akt et l'actine confirme l'importance de Akt dans le remaniement du cytosquelette et ouvre un nouveau champ d'investigation des phénomènes de réorganisation du cytosquelette et des effets de Akt sur la migration cellulaire et l'invasion. Bien qu'il soit très probable que d'autres substrats de Akt restent à découvrir, la compréhension des effets de la voie de signalisation PI3K/Akt ne se base déjà plus sur la connaissance de quelques substrats mais sur l'intégration des signaux au sein d'un vaste réseau dont les ramifications touchent la quasi-totalité des phénomènes cellulaires (Figure 34). Au final, ce travail de thèse ajoute 3 nouvelles « briques » à la signalisation de Akt et permet de proposer ces molécules comme cibles thérapeutiques potentielles dans le cancer du sein.

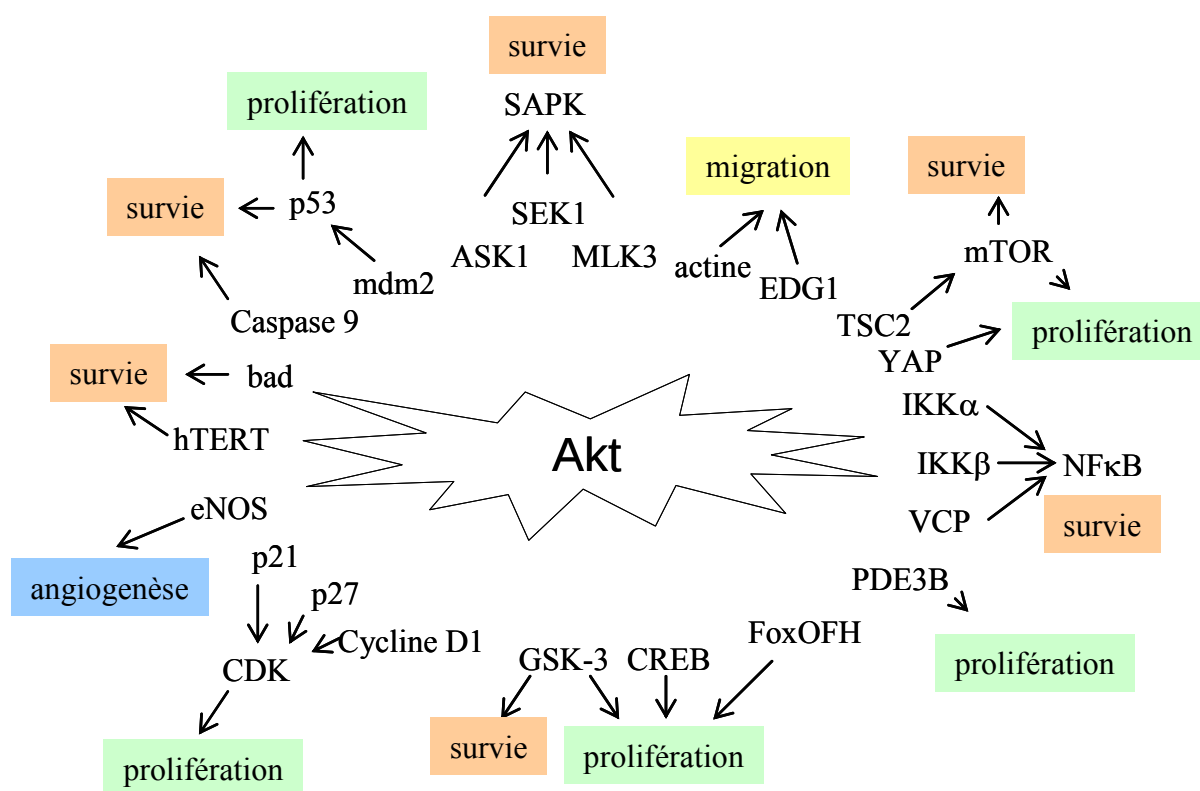


Figure 34. Signalisation actuellement connue de la kinase Akt. Autour de Akt sont représentés ses substrats directs. Ainsi que les molécules de signalisation et les effets biologiques qu'a leur phosphorylation par Akt (SAPK, stress-activated protein kinase ; SEK1, extracellular signal-regulated kinase 1 ; ASK1, apoptosis signal-regulating kinase 1 ; MLK3, Mixed lineage kinase 3 ; EDG1, endothelial differentiation gene 1 ; TSC2, tuberous sclerosis complex 2 ; YAP, yes-associated protein ; mTOR, mammalian target of rapamycin ; IKK, inhibitor kappaB kinase ; VCP, valosin-containing protein ; NF κ B, nuclear factor kappaB ; PDE-3B, phosphodiesterase 3B ; FKHR, forhead ; CREB, cAMP response element binding protein ; GSK3, glycogen synthase kinase 3 ; CDK, cyclin-dependent kinase ; eNOS, endothelial nitrogen synthase ; hTERT, human telomerase retrotranscriptase ; mdm2, murine double minute 2).

BIBLIOGRAPHIE

- Adams, J. M. and S. Cory (1998). "The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival." Science **281**(5381): 1322-6.
- Ahmad, F., L. N. Cong, L. Stenson Holst, L. M. Wang, T. Rahn Landstrom, J. H. Pierce, M. J. Quon, E. Degerman and V. C. Manganiello (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.
- Alessi, D. R., M. Andjelkovic, B. Caudwell, P. Cron, N. Morrice, P. Cohen and B. A. Hemmings (1996). "Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1." Embo J **15**(23): 6541-51.
- Alessi, D. R., F. B. Caudwell, M. Andjelkovic, B. A. Hemmings and P. Cohen (1996). "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., S. R. James, C. P. Downes, A. B. Holmes, P. R. Gaffney, C. B. Reese and P. Cohen (1997). "Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase Balpha." Curr Biol **7**(4): 261-9.
- Alterman, M. A., N. V. Gogichayeva and B. A. Kornilayev (2004). "Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry-based amino acid analysis." Anal Biochem **335**(2): 184-91.
- Andersen, J. S., C. J. Wilkinson, T. Mayor, P. Mortensen, E. A. Nigg and M. Mann (2003). "Proteomic characterization of the human centrosome by protein correlation profiling." Nature **426**(6966): 570-4.
- Anderson, R. A., I. V. Boronenkov, S. D. Doughman, J. Kunz and J. C. Loijens (1999). "Phosphatidylinositol phosphate kinases, a multifaceted family of signaling enzymes." J Biol Chem **274**(15): 9907-10.
- Andjelkovic, M., D. R. Alessi, R. Meier, A. Fernandez, N. J. Lamb, M. Frech, P. Cron, P. Cohen, J. M. Lucocq and B. A. Hemmings (1997). "Role of translocation in the activation and function of protein kinase B." J Biol Chem **272**(50): 31515-24.
- Andjelkovic, M., T. Jakubowicz, P. Cron, X. F. Ming, J. W. Han and B. A. Hemmings (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.
- Arnaud, E., C. Touriol, C. Boutonnet, M. C. Gensac, S. Vagner, H. Prats and A. C. Prats (1999). "A new 34-kilodalton isoform of human fibroblast growth factor 2 is cap dependently synthesized by using a non-AUG start codon and behaves as a survival factor." Mol Cell Biol **19**(1): 505-14.
- Arnold, A. and A. Papanikolaou (2005). "Cyclin D1 in breast cancer pathogenesis." J Clin Oncol **23**(18): 4215-24.
- Arrick, B. A., M. Korc and R. Derynck (1990). "Differential regulation of expression of three transforming growth factor beta species in human breast cancer cell lines by estradiol." Cancer Res **50**(2): 299-303.

- Arteaga, C. L., A. K. Tandon, D. D. Von Hoff and C. K. Osborne (1988). "Transforming growth factor beta: potential autocrine growth inhibitor of estrogen receptor-negative human breast cancer cells." Cancer Res **48**(14): 3898-904.
- Auld, G. C., D. G. Campbell, N. Morrice and P. Cohen (2005). "Identification of calcium-regulated heat stable protein of 24 kDa (CRHSP24) as a physiological substrate for PKB and RSK using KESTREL." Biochem J.
- Bacus, S. S., D. A. Altomare, L. Lyass, D. M. Chin, M. P. Farrell, K. Gurova, A. Gudkov and J. R. Testa (2002). "AKT2 is frequently upregulated in HER-2/neu-positive breast cancers and may contribute to tumor aggressiveness by enhancing cell survival." Oncogene **21**(22): 3532-40.
- Bader, G. D. and C. W. Hogue (2002). "Analyzing yeast protein-protein interaction data obtained from different sources." Nat Biotechnol **20**(10): 991-7.
- Balendran, A., A. Casamayor, M. Deak, A. Paterson, P. Gaffney, R. Currie, C. P. Downes and D. R. Alessi (1999). "PDK1 acquires PDK2 activity in the presence of a synthetic peptide derived from the carboxyl terminus of PRK2." Curr Biol **9**(8): 393-404.
- Ballif, B. A. and J. Blenis (2001). "Molecular mechanisms mediating mammalian mitogen-activated protein kinase (MAPK) kinase (MEK)-MAPK cell survival signals." Cell Growth Differ **12**(8): 397-408.
- Banerjee, A. (2002). "Increased levels of tyrosinated alpha-, beta(III)-, and beta(IV)-tubulin isotypes in paclitaxel-resistant MCF-7 breast cancer cells." Biochem Biophys Res Commun **293**(1): 598-601.
- Barkett, M. and T. D. Gilmore (1999). "Control of apoptosis by Rel/NF-kappaB transcription factors." Oncogene **18**(49): 6910-24.
- Barlund, M., F. Forozan, J. Kononen, L. Bubendorf, Y. Chen, M. L. Bittner, J. Torhorst, P. Haas, C. Bucher, G. Sauter, O. P. Kallioniemi and A. Kallioniemi (2000). "Detecting activation of ribosomal protein S6 kinase by complementary DNA and tissue microarray analysis." J Natl Cancer Inst **92**(15): 1252-9.
- Barlund, M., O. Monni, J. Kononen, R. Cornelison, J. Torhorst, G. Sauter, O.-P. Kallioniemi and A. Kallioniemi (2000). "Multiple genes at 17q23 undergo amplification and overexpression in breast cancer." Cancer Res **60**(19): 5340-4.
- Barthwal, M. K., P. Sathyanarayana, C. N. Kundu, B. Rana, A. Pradeep, C. Sharma, J. R. Woodgett and A. Rana (2003). "Negative regulation of mixed lineage kinase 3 by protein kinase B/AKT leads to cell survival." J Biol Chem **278**(6): 3897-902.
- Bartkova, J., M. Zemanova and J. Bartek (1996). "Abundance and subcellular localisation of cyclin D3 in human tumours." Int J Cancer **65**(3): 323-7.
- Basilico, C. and D. Moscatelli (1992). "The FGF family of growth factors and oncogenes." Adv Cancer Res **59**: 115-65.
- Basu, S., N. F. Totty, M. S. Irwin, M. Sudol and J. Downward (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.
- Bates, S. E., N. E. Davidson, E. M. Valverius, C. E. Freter, R. B. Dickson, J. P. Tam, J. E. Kudlow, M. E. Lippman and D. S. Salomon (1988). "Expression of transforming growth factor alpha and its messenger ribonucleic acid in human breast cancer: its

- regulation by estrogen and its possible functional significance." Mol Endocrinol **2**(6): 543-55.
- Bayascas, J. R. and D. R. Alessi (2005). "Regulation of Akt/PKB Ser473 phosphorylation." Mol Cell **18**(2): 143-5.
- Bellacosa, A., T. O. Chan, N. N. Ahmed, K. Datta, S. Malstrom, D. Stokoe, F. McCormick, J. Feng and P. Tsichlis (1998). "Akt activation by growth factors is a multiple-step process: the role of the PH domain." Oncogene **17**(3): 313-25.
- Bellacosa, A., D. de Feo, A. K. Godwin, D. W. Bell, J. Q. Cheng, D. A. Altomare, M. Wan, L. Dubeau, G. Scambia, V. Masciullo and et al. (1995). "Molecular alterations of the AKT2 oncogene in ovarian and breast carcinomas." Int J Cancer **64**(4): 280-5.
- Bellacosa, A., T. F. Franke, M. E. Gonzalez-Portal, K. Datta, T. Taguchi, J. Gardner, J. Q. Cheng, J. R. Testa and P. N. Tsichlis (1993). "Structure, expression and chromosomal mapping of c-akt: relationship to v-akt and its implications." Oncogene **8**(3): 745-54.
- Bellacosa, A., J. R. Testa, S. P. Staal and P. N. Tsichlis (1991). "A retroviral oncogene, akt, encoding a serine-threonine kinase containing an SH2-like region." Science **254**(5029): 274-7.
- Bellot, F., G. Crumley, J. M. Kaplow, J. Schlessinger, M. Jaye and C. A. Dionne (1991). "Ligand-induced transphosphorylation between different FGF receptors." Embo J **10**(10): 2849-54.
- Benson, J. R., M. Baum and A. A. Colletta (1996). "Role of TGF beta in the anti-estrogen response/resistance of human breast cancer." J Mammary Gland Biol Neoplasia **1**(4): 381-9.
- Bernal-Mizrachi, E., W. Wen, S. Stahlhut, C. M. Welling and M. A. Permutt (2001). "Islet beta cell expression of constitutively active Akt1/PKB alpha induces striking hypertrophy, hyperplasia, and hyperinsulinemia." J Clin Invest **108**(11): 1631-8.
- Berra, E., M. T. Diaz-Meco and J. Moscat (1998). "The activation of p38 and apoptosis by the inhibition of Erk is antagonized by the phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway." J Biol Chem **273**(17): 10792-7.
- Berwick, D. C., I. Hers, K. J. Heesom, S. K. Moule and J. M. Tavaré (2002). "The identification of ATP-citrate lyase as a protein kinase B (Akt) substrate in primary adipocytes." J Biol Chem **277**(37): 33895-900.
- Berx, G., K. F. Becker, H. Hofler and F. van Roy (1998). "Mutations of the human E-cadherin (CDH1) gene." Hum Mutat **12**(4): 226-37.
- Bi, L., I. Okabe, D. J. Bernard, A. Wynshaw-Boris and R. L. Nussbaum (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.
- Bieche, I. and R. Lidereau (1997). "[Somatic genetics of breast cancer]." Bull Cancer **84**(1): 83-96.
- Biemann, K. (1990). "Appendix 5. Nomenclature for peptide fragment ions (positive ions)." Methods Enzymol **193**: 886-7.
- Blagoev, B., I. Kratchmarova, S. E. Ong, M. Nielsen, L. J. Foster and M. Mann (2003). "A proteomics strategy to elucidate functional protein-protein interactions applied to EGF signaling." Nat Biotechnol **21**(3): 315-8.

- Blair, L. A., K. K. Bence-Hanulec, S. Mehta, T. Franke, D. Kaplan and J. Marshall (1999). "Akt-dependent potentiation of L channels by insulin-like growth factor-1 is required for neuronal survival." J Neurosci **19**(6): 1940-51.
- Blancato, J., B. Singh, A. Liu, D. J. Liao and R. B. Dickson (2004). "Correlation of amplification and overexpression of the c-myc oncogene in high-grade breast cancer: FISH, in situ hybridisation and immunohistochemical analyses." Br J Cancer **90**(8): 1612-9.
- Blanckaert, V. D., M. Hebbar, M. M. Louchez, M. O. Vilain, M. E. Schelling and J. P. Peyrat (1998). "Basic fibroblast growth factor receptors and their prognostic value in human breast cancer." Clin Cancer Res **4**(12): 2939-47.
- Blume-Jensen, P. and T. Hunter (2001). "Oncogenic kinase signalling." Nature **411**(6835): 355-65.
- Borlado, L. R., C. Redondo, B. Alvarez, C. Jimenez, L. M. Criado, J. Flores, M. A. Marcos, A. C. Martinez, D. Balomenos and A. C. Carrera (2000). "Increased phosphoinositide 3-kinase activity induces a lymphoproliferative disorder and contributes to tumor generation in vivo." Faseb J **14**(7): 895-903.
- Bourhis, X. L., R. A. Toillon, B. Boilly and H. Hondermarck (2000). "Autocrine and paracrine growth inhibitors of breast cancer cells." Breast Cancer Res Treat **60**(3): 251-8.
- Brodbeck, D., M. M. Hill and B. A. Hemmings (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.
- Brognard, J. and P. A. Dennis (2002). "Variable apoptotic response of NSCLC cells to inhibition of the MEK/ERK pathway by small molecules or dominant negative mutants." Cell Death Differ **9**(9): 893-904.
- Bronzert, D. A., P. Pantazis, H. N. Antoniades, A. Kasid, N. Davidson, R. B. Dickson and M. E. Lippman (1987). "Synthesis and secretion of platelet-derived growth factor by human breast cancer cell lines." Proc Natl Acad Sci U S A **84**(16): 5763-7.
- Bryant, D. M., F. G. Wylie and J. L. Stow (2005). "Regulation of endocytosis, nuclear translocation, and signaling of fibroblast growth factor receptor 1 by E-cadherin." Mol Biol Cell **16**(1): 14-23.
- Brymora, A., M. A. Cousin, B. D. Roufogalis and P. J. Robinson (2001). "Enhanced protein recovery and reproducibility from pull-down assays and immunoprecipitations using spin columns." Anal Biochem **295**(1): 119-22.
- Bugler, B., F. Amalric and H. Prats (1991). "Alternative initiation of translation determines cytoplasmic or nuclear localization of basic fibroblast growth factor." Mol Cell Biol **11**(1): 573-7.
- Burgering, B. M. and P. J. Coffey (1995). "Protein kinase B (c-Akt) in phosphatidylinositol-3-OH kinase signal transduction." Nature **376**(6541): 599-602.
- Burgering, B. M. and R. H. Medema (2003). "Decisions on life and death: FOXO Forkhead transcription factors are in command when PKB/Akt is off duty." J Leukoc Biol **73**(6): 689-701.

- Burgess, W. H. and T. Maciag (1989). "The heparin-binding (fibroblast) growth factor family of proteins." Annu Rev Biochem **58**: 575-606.
- Cardone, M. H., N. Roy, H. R. Stennicke, G. S. Salvesen, T. F. Franke, E. Stanbridge, S. Frisch and J. C. Reed (1998). "Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation." Science **282**(5392): 1318-21.
- Carlier, M. F. (1991). "Actin: protein structure and filament dynamics." J Biol Chem **266**(1): 1-4.
- Cartledge, R. A., A. Knebel, M. Pegg, A. Alexandrov, E. M. Phizicky and P. Cohen (2005). "The tRNA methylase METTL1 is phosphorylated and inactivated by PKB and RSK in vitro and in cells." Embo J **24**(9): 1696-705.
- Castillo, S. S., J. Brognard, P. A. Petukhov, C. Zhang, J. Tsurutani, C. A. Granville, M. Li, M. Jung, K. A. West, J. G. Gills, A. P. Kozikowski and P. A. Dennis (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.
- Castoria, G., A. Migliaccio, A. Bilancio, M. Di Domenico, A. de Falco, M. Lombardi, R. Fiorentino, L. Varricchio, M. V. Barone and F. Auricchio (2001). "PI3-kinase in concert with Src promotes the S-phase entry of oestradiol-stimulated MCF-7 cells." Embo J **20**(21): 6050-9.
- Cenni, V., A. Sirri, M. Riccio, G. Lattanzi, S. Santi, A. de Pol, N. M. Maraldi and S. Marmioli (2003). "Targeting of the Akt/PKB kinase to the actin skeleton." Cell Mol Life Sci **60**(12): 2710-20.
- Chen, Q., D. W. Powell, M. J. Rane, S. Singh, W. Butt, J. B. Klein and K. R. McLeish (2003). "Akt phosphorylates p47phox and mediates respiratory burst activity in human neutrophils." J Immunol **170**(10): 5302-8.
- Chen, R. H., Y. H. Su, R. L. Chuang and T. Y. Chang (1998). "Suppression of transforming growth factor-beta-induced apoptosis through a phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-dependent pathway." Oncogene **17**(15): 1959-68.
- Cheng, J. Q., B. Ruggeri, W. M. Klein, G. Sonoda, D. A. Altomare, D. K. Watson and J. R. Testa (1996). "Amplification of AKT2 in human pancreatic cells and inhibition of AKT2 expression and tumorigenicity by antisense RNA." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(8): 3636-41.
- Cho, H., J. Mu, J. K. Kim, J. L. Thorvaldsen, Q. Chu, E. B. Crenshaw, 3rd, K. H. Kaestner, M. S. Bartolomei, G. I. Shulman and M. J. Birnbaum (2001). "Insulin resistance and a diabetes mellitus-like syndrome in mice lacking the protein kinase Akt2 (PKB beta)." Science **292**(5522): 1728-31.
- Cho, H., J. L. Thorvaldsen, Q. Chu, F. Feng and M. J. Birnbaum (2001). "Akt1/PKBalpha is required for normal growth but dispensable for maintenance of glucose homeostasis in mice." J Biol Chem **276**(42): 38349-52.
- Chowdhury, S. K., V. Katta and B. T. Chait (1990). "Electrospray ionization mass spectrometric peptide mapping: a rapid, sensitive technique for protein structure analysis." Biochem Biophys Res Commun **167**(2): 686-92.
- Clark, A. S., K. West, S. Streicher and P. A. Dennis (2002). "Constitutive and inducible Akt activity promotes resistance to chemotherapy, trastuzumab, or tamoxifen in breast cancer cells." Mol Cancer Ther **1**(9): 707-17.

- Clevenger, C. V. (2003). "Role of prolactin/prolactin receptor signaling in human breast cancer." Breast Dis **18**: 75-86.
- Coffer, P. J. and J. R. Woodgett (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.
- Colby, S., T. King and J. Reilly (1994). "Improving the resolution of matrix assisted laser desorption/ionization mass spectrometry by exploiting the correlation between ion position and velocity." Rapid Commun. Mass Spectrom. **8**: 865-868.
- Coleman, S. and C. W. Daniel (1990). "Inhibition of mouse mammary ductal morphogenesis and down-regulation of the EGF receptor by epidermal growth factor." Dev Biol **137**(2): 425-33.
- Cowley, S. M., S. Hoare, S. Mosselman and M. G. Parker (1997). "Estrogen receptors alpha and beta form heterodimers on DNA." J Biol Chem **272**(32): 19858-62.
- Cowin, P., T. M. Rowlands and S. J. Hatsell (2005). "Cadherins and catenins in breast cancer." Curr Opin Cell Biol.
- Cross, D. A., D. R. Alessi, P. Cohen, M. Andjelkovich and B. A. Hemmings (1995). "Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B." Nature **378**(6559): 785-9.
- Crowder, R. J. and R. S. Freeman (1998). "Phosphatidylinositol 3-kinase and Akt protein kinase are necessary and sufficient for the survival of nerve growth factor-dependent sympathetic neurons." J Neurosci **18**(8): 2933-43.
- Currie, R. A., K. S. Walker, A. Gray, M. Deak, A. Casamayor, C. P. Downes, P. Cohen, D. R. Alessi and J. Lucocq (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.
- Dai, R. M., E. Chen, D. L. Longo, C. M. Gorbea and C. C. Li (1998). "Involvement of valosin-containing protein, an ATPase Co-purified with IkappaBalpha and 26 S proteasome, in ubiquitin-proteasome-mediated degradation of IkappaBalpha." J Biol Chem **273**(6): 3562-73.
- Dai, R. M. and C. C. Li (2001). "Valosin-containing protein is a multi-ubiquitin chain-targeting factor required in ubiquitin-proteasome degradation." Nat Cell Biol **3**(8): 740-4.
- Dailey, L., E. Laplantine, R. Priore and C. Basilico (2003). "A network of transcriptional and signaling events is activated by FGF to induce chondrocyte growth arrest and differentiation." J Cell Biol **161**(6): 1053-66.
- Daly, R. J., H. Gu, J. Parmar, S. Malaney, R. J. Lyons, R. Kairouz, D. R. Head, S. M. Henshall, B. G. Neel and R. L. Sutherland (2002). "The docking protein Gab2 is overexpressed and estrogen regulated in human breast cancer." Oncogene **21**(33): 5175-81.
- Dan, H. C., M. Sun, L. Yang, R. I. Feldman, X. M. Sui, C. C. Ou, M. Nellist, R. S. Yeung, D. J. Halley, S. V. Nicosia, W. J. Pledger and J. Q. Cheng (2002). "Phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway regulates tuberous sclerosis tumor suppressor complex by phosphorylation of tuberlin." J Biol Chem **277**(38): 35364-70.

- Datta, S. R., A. Brunet and M. E. Greenberg (1999). "Cellular survival: a play in three Akts." Genes Dev **13**(22): 2905-27.
- Datta, S. R., H. Dudek, X. Tao, S. Masters, H. Fu, Y. Gotoh and M. E. Greenberg (1997). "Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery." Cell **91**(2): 231-41.
- Davidson, B., R. Reich, P. Lazarovici, V. Ann Florenes, S. Nielsen and J. M. Nesland (2004). "Altered expression and activation of the nerve growth factor receptors TrkA and p75 provide the first evidence of tumor progression to effusion in breast carcinoma." Breast Cancer Res Treat **83**(2): 119-28.
- del Peso, L., M. Gonzalez-Garcia, C. Page, R. Herrera and G. Nunez (1997). "Interleukin-3-induced phosphorylation of BAD through the protein kinase Akt." Science **278**(5338): 687-9.
- Dell'Era, P., M. Mohammadi and M. Presta (1999). "Different tyrosine autophosphorylation requirements in fibroblast growth factor receptor-1 mediate urokinase-type plasminogen activator induction and mitogenesis." Mol Biol Cell **10**(1): 23-33.
- Descamps, S., X. Lebourhis, M. Delehedde, B. Boilly and H. Hondermarck (1998). "Nerve growth factor is mitogenic for cancerous but not normal human breast epithelial cells." J Biol Chem **273**(27): 16659-62.
- Descamps, S., R. A. Toillon, E. Adriaenssens, V. Pawlowski, S. M. Cool, V. Nurcombe, X. Le Bourhis, B. Boilly, J. P. Peyrat and H. Hondermarck (2001). "Nerve growth factor stimulates proliferation and survival of human breast cancer cells through two distinct signaling pathways." J Biol Chem **276**(21): 17864-70.
- Devilee, P., J. Hermans, J. Eyfjord, A. L. Boorresen, R. Liderau, H. Sobol, A. Borg, A. M. Cleton-Jansen, E. Olah, B. B. Cohen, S. Scherneck, U. Hamann, B. Peterlin, M. Caligo, Y. J. Bignon and C. Maugard (1997). "Loss of heterozygosity at 7q31 in breast cancer: results from an International Collaborative Study Group. The Breast Cancer Somatic Genetics Consortium." Genes Chromosomes Cancer **18**(3): 193-9.
- Di Cristofano, A., B. Pesce, C. Cordon-Cardo and P. P. Pandolfi (1998). "Pten is essential for embryonic development and tumour suppression." Nat Genet **19**(4): 348-55.
- Dickson, C., B. Spencer-Dene, C. Dillon and V. Fantl (2000). "Tyrosine kinase signalling in breast cancer: fibroblast growth factors and their receptors." Breast Cancer Res **2**(3): 191-6.
- Dickson, R. B., M. E. McManaway and M. E. Lippman (1986). "Estrogen-induced factors of breast cancer cells partially replace estrogen to promote tumor growth." Science **232**(4757): 1540-3.
- Diehl, J. A., M. Cheng, M. F. Roussel and C. J. Sherr (1998). "Glycogen synthase kinase-3beta regulates cyclin D1 proteolysis and subcellular localization." Genes Dev **12**(22): 3499-511.
- Dijkers, P. F., R. H. Medema, C. Pals, L. Banerji, N. S. Thomas, E. W. Lam, B. M. Burgering, J. A. Raaijmakers, J. W. Lammers, L. Koenderman and P. J. Coffey (2000). "Forkhead transcription factor FKHR-L1 modulates cytokine-dependent transcriptional regulation of p27(KIP1)." Mol Cell Biol **20**(24): 9138-48.
- Dionne, C. A., G. Crumley, F. Bellot, J. M. Kaplow, G. Searfoss, M. Ruta, W. H. Burgess, M. Jaye and J. Schlessinger (1990). "Cloning and expression of two distinct high-affinity

- receptors cross-reacting with acidic and basic fibroblast growth factors." Embo J **9**(9): 2685-92.
- Doble, B. W. and J. R. Woodgett (2003). "GSK-3: tricks of the trade for a multi-tasking kinase." J Cell Sci **116**(Pt 7): 1175-86.
- Dolle, L., E. Adriaenssens, I. El Yazidi-Belkoura, X. Le Bourhis, V. Nurcombe and H. Hondermarck (2004). "Nerve growth factor receptors and signaling in breast cancer." Curr Cancer Drug Targets **4**(6): 463-70.
- Dolle, L., I. El Yazidi-Belkoura, E. Adriaenssens, V. Nurcombe and H. Hondermarck (2003). "Nerve growth factor overexpression and autocrine loop in breast cancer cells." Oncogene **22**(36): 5592-601.
- Donepudi, M. and M. G. Grutter (2002). "Structure and zymogen activation of caspases." Biophys Chem **101-102**: 145-53.
- Du, K. and M. Montminy (1998). "CREB is a regulatory target for the protein kinase Akt/PKB." J Biol Chem **273**(49): 32377-9.
- Dudek, H., S. R. Datta, T. F. Franke, M. J. Birnbaum, R. Yao, G. M. Cooper, R. A. Segal, D. R. Kaplan and M. E. Greenberg (1997). "Regulation of neuronal survival by the serine-threonine protein kinase Akt." Science **275**(5300): 661-5.
- Edinger, A. L. and C. B. Thompson (2002). "Akt maintains cell size and survival by increasing mTOR-dependent nutrient uptake." Mol Biol Cell **13**(7): 2276-88.
- el Yazidi, I. and Y. Boilly-Marer (1995). "Production of acidic and basic fibroblast growth factor by the hormone- independent breast cancer cell line MDA-MB-231." Anticancer Res **15**(3): 783-90.
- El Yazidi, I., F. Renaud, M. Laurent, Y. Courtois and Y. Boilly-Marer (1998). "Production and oestrogen regulation of FGF1 in normal and cancer breast cells." Biochim Biophys Acta **1403**(2): 127-40.
- El Yazidi-Belkoura, I., E. Adriaenssens, L. Dolle, S. Descamps and H. Hondermarck (2003). "Tumor necrosis factor receptor-associated death domain protein is involved in the neurotrophin receptor-mediated antiapoptotic activity of nerve growth factor in breast cancer cells." J Biol Chem **278**(19): 16952-6.
- Espie, M., A. Gorins and A. Gorins (1995). "Le sein." Editions ESKA, Paris.
- Essmann, F., I. H. Engels, G. Totzke, K. Schulze-Osthoff and R. U. Janicke (2004). "Apoptosis resistance of MCF-7 breast carcinoma cells to ionizing radiation is independent of p53 and cell cycle control but caused by the lack of caspase-3 and a caffeine-inhibitable event." Cancer Res **64**(19): 7065-72.
- Ethier, S. P. (1995). "Growth factor synthesis and human breast cancer progression." J Natl Cancer Inst **87**(13): 964-73.
- Eves, E. M., W. Xiong, A. Bellacosa, S. G. Kennedy, P. N. Tsichlis, M. R. Rosner and N. Hay (1998). "Akt, a target of phosphatidylinositol 3-kinase, inhibits apoptosis in a differentiating neuronal cell line." Mol Cell Biol **18**(4): 2143-52.
- Fabrizio, P., F. Pozza, S. D. Pletcher, C. M. Gendron and V. D. Longo (2001). "Regulation of longevity and stress resistance by Sch9 in yeast." Science **292**(5515): 288-90.
- Fenig, E., R. Wieder, S. Paglin, H. Wang, R. Persaud, A. Haimovitz-Friedman, Z. Fuks and J. Yahalom (1997). "Basic fibroblast growth factor confers growth inhibition and

- mitogen-activated protein kinase activation in human breast cancer cells." Clin Cancer Res **3**(1): 135-42.
- Fenn, J. B., M. Mann, C. K. Meng, S. F. Wong and C. M. Whitehouse (1989). "Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules." Science **246**(4926): 64-71.
- Ferguson, A. T., E. Evron, C. B. Umbricht, T. K. Pandita, T. A. Chan, H. Hermeking, J. R. Marks, A. R. Lambers, P. A. Futreal, M. R. Stampfer and S. Sukumar (2000). "High frequency of hypermethylation at the 14-3-3 sigma locus leads to gene silencing in breast cancer." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(11): 6049-54.
- Ferguson, K. M., J. M. Kavran, V. G. Sankaran, E. Fournier, S. J. Isakoff, E. Y. Skolnik and M. A. Lemmon (2000). "Structural basis for discrimination of 3-phosphoinositides by pleckstrin homology domains." Mol Cell **6**(2): 373-84.
- Ficarro, S. B., M. L. McClelland, P. T. Stukenberg, D. J. Burke, M. M. Ross, J. Shabanowitz, D. F. Hunt and F. M. White (2002). "Phosphoproteome analysis by mass spectrometry and its application to *Saccharomyces cerevisiae*." Nat Biotechnol **20**(3): 301-5.
- Figueroa, J. A. and D. Yee (1992). "The insulin-like growth factor binding proteins (IGFBPs) in human breast cancer." Breast Cancer Res Treat **22**(1): 81-90.
- Filippa, N., C. L. Sable, C. Filloux, B. Hemmings and E. Van Obberghen (1999). "Mechanism of protein kinase B activation by cyclic AMP-dependent protein kinase." Mol Cell Biol **19**(7): 4989-5000.
- Florkiewicz, R. Z. and A. Sommer (1989). "Human basic fibroblast growth factor gene encodes four polypeptides: three initiate translation from non-AUG codons." Proc Natl Acad Sci U S A **86**(11): 3978-81.
- Foehr, E. D., S. Raffioni, R. Fuji and R. A. Bradshaw (1998). "FGF signal transduction in PC12 cells: comparison of the responses induced by endogenous and chimeric receptors." Immunol Cell Biol **76**(5): 406-13.
- Foster, L. J., C. L. De Hoog and M. Mann (2003). "Unbiased quantitative proteomics of lipid rafts reveals high specificity for signaling factors." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(10): 5813-8.
- Franke, T. F., D. R. Kaplan, L. C. Cantley and A. Toker (1997). "Direct regulation of the Akt proto-oncogene product by phosphatidylinositol-3,4-bisphosphate." Science **275**(5300): 665-8.
- Franke, T. F., S. I. Yang, T. O. Chan, K. Datta, A. Kazlauskas, D. K. Morrison, D. R. Kaplan and P. N. Tsichlis (1995). "The protein kinase encoded by the Akt proto-oncogene is a target of the PDGF-activated phosphatidylinositol 3-kinase." Cell **81**(5): 727-36.
- Frasca, F., G. Pandini, R. Vigneri and I. D. Goldfine (2003). "Insulin and hybrid insulin/IGF receptors are major regulators of breast cancer cells." Breast Dis **17**: 73-89.
- Frech, M., M. Andjelkovic, E. Ingley, K. K. Reddy, J. R. Falck and B. A. Hemmings (1997). "High affinity binding of inositol phosphates and phosphoinositides to the pleckstrin homology domain of RAC/protein kinase B and their influence on kinase activity." J Biol Chem **272**(13): 8474-81.
- Friesel, R. E. and T. Maciag (1995). "Molecular mechanisms of angiogenesis: fibroblast growth factor signal transduction." Faseb J **9**(10): 919-25.
- Fruman, D. A., F. Mauvais-Jarvis, D. A. Pollard, C. M. Yballe, D. Brazil, R. T. Bronson, C. R. Kahn and L. C. Cantley (2000). "Hypoglycaemia, liver necrosis and perinatal death

- in mice lacking all isoforms of phosphoinositide 3-kinase p85 alpha." Nat Genet **26**(3): 379-82.
- Fruman, D. A., S. B. Snapper, C. M. Yballe, F. W. Alt and L. C. Cantley (1999). "Phosphoinositide 3-kinase knockout mice: role of p85alpha in B cell development and proliferation." Biochem Soc Trans **27**(4): 624-9.
- Fujita, E., A. Jinbo, H. Matuzaki, H. Konishi, U. Kikkawa and T. Momoi (1999). "Akt phosphorylation site found in human caspase-9 is absent in mouse caspase-9." Biochem Biophys Res Commun **264**(2): 550-5.
- Futreal, P. A., Q. Liu, D. Shattuck-Eidens, C. Cochran, K. Harshman, S. Tavtigian, L. M. Bennett, A. Haugen-Strano, J. Swensen, Y. Miki and et al. (1994). "BRCA1 mutations in primary breast and ovarian carcinomas." Science **266**(5182): 120-2.
- Gao, T., F. Furnari and A. C. Newton (2005). "PHLPP: a phosphatase that directly dephosphorylates Akt, promotes apoptosis, and suppresses tumor growth." Mol Cell **18**(1): 13-24.
- Gardner, W. U. (1959). "Sensitivity of the vagina to estrogen: genetic and transmitted differences." Ann N Y Acad Sci **83**: 145-59.
- Garnier, M., C. Giamarchi, I. Delrieu, M. C. Rio, P. Chinestra, F. Bayard, M. Poirot and J. C. Faye (2003). "Insulin and estrogen receptor ligand influence the FGF-2 activities in MCF-7 breast cancer cells." Biochem Pharmacol **65**(4): 629-36.
- Gasco, M., S. Shami and T. Crook (2002). "The p53 pathway in breast cancer." Breast Cancer Res **4**(2): 70-6.
- Gavin, A. C., M. Bosche, R. Krause, P. Grandi, M. Marzioch, A. Bauer, J. Schultz, J. M. Rick, A. M. Michon, C. M. Cruciat, M. Remor, C. Hofert, M. Schelder, M. Brajenovic, H. Ruffner, A. Merino, K. Klein, M. Hudak, D. Dickson, T. Rudi, V. Gnau, A. Bauch, S. Bastuck, B. Huhse, C. Leutwein, M. A. Heurtier, R. R. Copley, A. Edelmann, E. Querfurth, V. Rybin, G. Drewes, M. Raida, T. Bouwmeester, P. Bork, B. Seraphin, B. Kuster, G. Neubauer and G. Superti-Furga (2002). "Functional organization of the yeast proteome by systematic analysis of protein complexes." Nature **415**(6868): 141-7.
- Gerber, H. P., A. McMurtrey, J. Kowalski, M. Yan, B. A. Keyt, V. Dixit and N. Ferrara (1998). "Vascular endothelial growth factor regulates endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt signal transduction pathway. Requirement for Flk-1/KDR activation." J Biol Chem **273**(46): 30336-43.
- Gerner, C., U. Frohwein, J. Gotzmann, E. Bayer, D. Gelbmann, W. Bursch and R. Schulte-Hermann (2000). "The Fas-induced apoptosis analyzed by high throughput proteome analysis." J Biol Chem **275**(50): 39018-26.
- Ghaemmaghami, S., W. K. Huh, K. Bower, R. W. Howson, A. Belle, N. Dephoure, E. K. O'Shea and J. S. Weissman (2003). "Global analysis of protein expression in yeast." Nature **425**(6959): 737-41.
- Goberdhan, D. C., N. Paricio, E. C. Goodman, M. Mlodzik and C. Wilson (1999). "Drosophila tumor suppressor PTEN controls cell size and number by antagonizing the Chico/PI3-kinase signaling pathway." Genes Dev **13**(24): 3244-58.
- Goshe, M. B., J. Blonder and R. D. Smith (2003). "Affinity labeling of highly hydrophobic integral membrane proteins for proteome-wide analysis." J Proteome Res **2**(2): 153-61.

- Gospodarowicz, D., K. L. Jones and G. Sato (1974). "Purification of a growth factor for ovarian cells from bovine pituitary glands." Proc Natl Acad Sci U S A **71**(6): 2295-9.
- Gotoh, N., S. Laks, M. Nakashima, I. Lax and J. Schlessinger (2004). "FRS2 family docking proteins with overlapping roles in activation of MAP kinase have distinct spatial-temporal patterns of expression of their transcripts." FEBS Lett **564**(1-2): 14-8.
- Gottlieb, T. M., J. F. Leal, R. Seger, Y. Taya and M. Oren (2002). "Cross-talk between Akt, p53 and Mdm2: possible implications for the regulation of apoptosis." Oncogene **21**(8): 1299-303.
- Graff, J. R., B. W. Konicek, A. M. McNulty, Z. Wang, K. Houck, S. Allen, J. D. Paul, A. Hbaiu, R. G. Goode, G. E. Sandusky, R. L. Vessella and B. L. Neubauer (2000). "Increased AKT activity contributes to prostate cancer progression by dramatically accelerating prostate tumor growth and diminishing p27Kip1 expression." J Biol Chem **275**(32): 24500-5.
- Greenblatt, M. S., P. O. Chappuis, J. P. Bond, N. Hamel and W. D. Foulkes (2001). "TP53 mutations in breast cancer associated with BRCA1 or BRCA2 germ-line mutations: distinctive spectrum and structural distribution." Cancer Res **61**(10): 4092-7.
- Greene, G. L., P. Gilna, M. Waterfield, A. Baker, Y. Hort and J. Shine (1986). "Sequence and expression of human estrogen receptor complementary DNA." Science **231**(4742): 1150-4.
- Greene, G. L. and M. F. Press (1986). "Structure and dynamics of the estrogen receptor." J Steroid Biochem **24**(1): 1-7.
- Gronborg, M., T. Z. Kristiansen, A. Stensballe, J. S. Andersen, O. Ohara, M. Mann, O. N. Jensen and A. Pandey (2002). "A mass spectrometry-based proteomic approach for identification of serine/threonine-phosphorylated proteins by enrichment with phospho-specific antibodies: identification of a novel protein, Frigg, as a protein kinase A substrate." Mol Cell Proteomics **1**(7): 517-27.
- Gu, H., H. Maeda, J. J. Moon, J. D. Lord, M. Yoakim, B. H. Nelson and B. G. Neel (2000). "New role for Shc in activation of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway." Mol Cell Biol **20**(19): 7109-20.
- Gu, H., J. C. Pratt, S. J. Burakoff and B. G. Neel (1998). "Cloning of p97/Gab2, the major SHP2-binding protein in hematopoietic cells, reveals a novel pathway for cytokine-induced gene activation." Mol Cell **2**(6): 729-40.
- Haab, B. B., M. J. Dunham and P. O. Brown (2001). "Protein microarrays for highly parallel detection and quantitation of specific proteins and antibodies in complex solutions." Genome Biol **2**(2): RESEARCH0004.
- Hadari, Y. R., H. Kouhara, I. Lax and J. Schlessinger (1998). "Binding of Shp2 tyrosine phosphatase to FRS2 is essential for fibroblast growth factor-induced PC12 cell differentiation." Mol Cell Biol **18**(7): 3966-73.
- Han, D. K., J. Eng, H. Zhou and R. Aebersold (2001). "Quantitative profiling of differentiation-induced microsomal proteins using isotope-coded affinity tags and mass spectrometry." Nat Biotechnol **19**(10): 946-51.
- Hanada, M., J. Feng and B. A. Hemmings (2004). "Structure, regulation and function of PKB/AKT--a major therapeutic target." Biochim Biophys Acta **1697**(1-2): 3-16.
- Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2000). "The hallmarks of cancer." Cell **100**(1): 57-70.

- Hansen, R. and M. Bissell (2000). "Tissue Architecture and Breast Cancer: the Role of Extracellular Matrix and Steroids Hormones." Endocrine- Related Cancer **7**: 95-113.
- Harari, D. and Y. Yarden (2000). "Molecular mechanisms underlying ErbB2/HER2 action in breast cancer." Oncogene **19**(53): 6102-14.
- Harrison, P. M., A. Kumar, N. Lang, M. Snyder and M. Gerstein (2002). "A question of size: the eukaryotic proteome and the problems in defining it." Nucleic Acids Res **30**(5): 1083-90.
- Hausler, P., G. Papoff, A. Eramo, K. Reif, D. A. Cantrell and G. Ruberti (1998). "Protection of CD95-mediated apoptosis by activation of phosphatidylinositol 3-kinase and protein kinase B." Eur J Immunol **28**(1): 57-69.
- Heimann, R., F. Lan, R. McBride and S. Hellman (2000). "Separating favorable from unfavorable prognostic markers in breast cancer: the role of E-cadherin." Cancer Res **60**(2): 298-304.
- Henry, K. D., E. R. Williams, B. H. Wang, F. W. McLafferty, J. Shabanowitz and D. F. Hunt (1989). "Fourier-transform mass spectrometry of large molecules by electrospray ionization." Proc Natl Acad Sci U S A **86**(23): 9075-8.
- Henzel, W. J., T. M. Billeci, J. T. Stults, S. C. Wong, C. Grimley and C. Watanabe (1993). "Identifying proteins from two-dimensional gels by molecular mass searching of peptide fragments in protein sequence databases." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(11): 5011-5.
- Heymont, J., L. Berenfeld, J. Collins, A. Kaganovich, B. Maynes, A. Moulin, I. Ratskovskaya, P. P. Poon, G. C. Johnston, M. Kamenetsky, J. DeSilva, H. Sun, G. A. Petsko and J. Engebrecht (2000). "TEP1, the yeast homolog of the human tumor suppressor gene PTEN/MMAC1/TEP1, is linked to the phosphatidylinositol pathway and plays a role in the developmental process of sporulation." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(23): 12672-7.
- Hill, K., S. Welti, J. Yu, J. T. Murray, S. C. Yip, J. S. Condeelis, J. E. Segall and J. M. Backer (2000). "Specific requirement for the p85-p110alpha phosphatidylinositol 3-kinase during epidermal growth factor-stimulated actin nucleation in breast cancer cells." J Biol Chem **275**(6): 3741-4.
- Hillenkamp, F. and M. Karas (1990). "Mass spectrometry of peptides and proteins by matrix-assisted ultraviolet laser desorption/ionization." Methods Enzymol **193**: 280-95.
- Hillenkamp, F., M. Karas, R. C. Beavis and B. T. Chait (1991). "Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of biopolymers." Anal Chem **63**(24): 1193A-1203A.
- Hirsch, E., M. P. Wymann, E. Patrucco, E. Tolosano, G. Bulgarelli-Leva, S. Marengo, M. Rocchi and F. Altruda (2000). "Analysis of the murine phosphoinositide 3-kinase gamma gene." Gene **256**(1-2): 69-81.
- Ho, Y., A. Gruhler, A. Heilbut, G. D. Bader, L. Moore, S. L. Adams, A. Millar, P. Taylor, K. Bennett, K. Boutilier, L. Yang, C. Wolting, I. Donaldson, S. Schandorff, J. Shewnarane, M. Vo, J. Taggart, M. Goudreau, B. Musk, C. Alfarano, D. Dewar, Z. Lin, K. Michalickova, A. R. Willems, H. Sassi, P. A. Nielsen, K. J. Rasmussen, J. R. Andersen, L. E. Johansen, L. H. Hansen, H. Jespersen, A. Podtelejnikov, E. Nielsen, J. Crawford, V. Poulsen, B. D. Sorensen, J. Matthiesen, R. C. Hendrickson, F. Gleeson, T. Pawson, M. F. Moran, D. Durocher, M. Mann, C. W. Hogue, D. Figeys and M.

- Tyers (2002). "Systematic identification of protein complexes in *Saccharomyces cerevisiae* by mass spectrometry." Nature **415**(6868): 180-3.
- Holgado-Madruga, M., D. K. Moscatello, D. R. Emlet, R. Dieterich and A. J. Wong (1997). "Grb2-associated binder-1 mediates phosphatidylinositol 3-kinase activation and the promotion of cell survival by nerve growth factor." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(23): 12419-24.
- Honda, K., T. Yamada, R. Endo, Y. Ino, M. Gotoh, H. Tsuda, Y. Yamada, H. Chiba and S. Hirohashi (1998). "Actinin-4, a novel actin-bundling protein associated with cell motility and cancer invasion." J Cell Biol **140**(6): 1383-93.
- Hondermarck, H. (2003). "Breast cancer: when proteomics challenges biological complexity." Mol Cell Proteomics **2**(5): 281-91.
- Hondermarck, H. (2004). "Proteomics: Biomedical and Pharmaceucical Applications." Kluwer Academic Publishers.
- Houdebine (1997). "Biologie de la Lactation." gynécologie/obstétrique, Enc. Med. Chir. **5-008-A-30**(15).
- Hu, M., J. Yao, L. Cai, K. E. Bachman, F. van den Brule, V. Velculescu and K. Polyak (2005). "Distinct epigenetic changes in the stromal cells of breast cancers." Nat Genet.
- Huddleston, M. J., M. F. Bean and S. A. Carr (1993). "Collisional fragmentation of glycopeptides by electrospray ionization LC/MS and LC/MS/MS: methods for selective detection of glycopeptides in protein digests." Anal Chem **65**(7): 877-84.
- Hutcheson, I. R., J. M. Knowlden, T. A. Madden, D. Barrow, J. M. Gee, A. E. Wakeling and R. I. Nicholson (2003). "Oestrogen receptor-mediated modulation of the EGFR/MAPK pathway in tamoxifen-resistant MCF-7 cells." Breast Cancer Res Treat **81**(1): 81-93.
- Hutchinson, J. N. and W. J. Muller (2000). "Transgenic mouse models of human breast cancer." Oncogene **19**(53): 6130-7.
- Ibarrola, N., H. Molina, A. Iwahori and A. Pandey (2004). "A novel proteomic approach for specific identification of tyrosine kinase substrates using [13C]tyrosine." J Biol Chem **279**(16): 15805-13.
- Ibrahimi, O. A., F. Zhang, S. C. Hrstka, M. Mohammadi and R. J. Linhardt (2004). "Kinetic model for FGF, FGFR, and proteoglycan signal transduction complex assembly." Biochemistry **43**(16): 4724-30.
- Inoki, K., Y. Li, T. Zhu, J. Wu and K. L. Guan (2002). "TSC2 is phosphorylated and inhibited by Akt and suppresses mTOR signalling." Nat Cell Biol **4**(9): 648-57.
- Iozzo, R. V. (1998). "Matrix proteoglycans: from molecular design to cellular function." Annu Rev Biochem **67**: 609-52.
- Ireton, R. C., M. A. Davis, J. van Hengel, D. J. Mariner, K. Barnes, M. A. Thoreson, P. Z. Anastasiadis, L. Matrisian, L. M. Bundy, L. Sealy, B. Gilbert, F. van Roy and A. B. Reynolds (2002). "A novel role for p120 catenin in E-cadherin function." J Cell Biol **159**(3): 465-76.
- Ito, T., T. Chiba, R. Ozawa, M. Yoshida, M. Hattori and Y. Sakaki (2001). "A comprehensive two-hybrid analysis to explore the yeast protein interactome." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(8): 4569-74.

- Itoh, N., S. Semba, M. Ito, H. Takeda, S. Kawata and M. Yamakawa (2002). "Phosphorylation of Akt/PKB is required for suppression of cancer cell apoptosis and tumor progression in human colorectal carcinoma." Cancer **94**(12): 3127-34.
- Jacobs, T. W., A. M. Gown, H. Yaziji, M. J. Barnes and S. J. Schnitt (2000). "HER-2/neu protein expression in breast cancer evaluated by immunohistochemistry. A study of interlaboratory agreement." Am J Clin Pathol **113**(2): 251-8.
- James, P., M. Quadroni, E. Carafoli and G. Gonnet (1993). "Protein identification by mass profile fingerprinting." Biochem Biophys Res Commun **195**(1): 58-64.
- James, S. R., C. P. Downes, R. Gigg, S. J. Grove, A. B. Holmes and D. R. Alessi (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.
- Johnson, G. L. and R. Lapadat (2002). "Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases." Science **298**(5600): 1911-2.
- Jones, P. F., T. Jakubowicz and B. A. Hemmings (1991). "Molecular cloning of a second form of rac protein kinase." Cell Regul **2**(12): 1001-9.
- Jones, R. G., M. Parsons, M. Bonnard, V. S. Chan, W. C. Yeh, J. R. Woodgett and P. S. Ohashi (2000). "Protein kinase B regulates T lymphocyte survival, nuclear factor kappaB activation, and Bcl-X(L) levels in vivo." J Exp Med **191**(10): 1721-34.
- Kanai, M., M. Goke, S. Tsunekawa and D. K. Podolsky (1997). "Signal transduction pathway of human fibroblast growth factor receptor 3. Identification of a novel 66-kDa phosphoprotein." J Biol Chem **272**(10): 6621-8.
- Kanamoto, T., U. Hellman, C. H. Heldin and S. Souchelnytskyi (2002). "Functional proteomics of transforming growth factor-beta1-stimulated Mv1Lu epithelial cells: Rad51 as a target of TGFbeta1-dependent regulation of DNA repair." Embo J **21**(5): 1219-30.
- Kane, L. P., V. S. Shapiro, D. Stokoe and A. Weiss (1999). "Induction of NF-kappaB by the Akt/PKB kinase." Curr Biol **9**(11): 601-4.
- Kane, S., H. Sano, S. C. Liu, J. M. Asara, W. S. Lane, C. C. Garner and G. E. Lienhard (2002). "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.
- Karin, M., Y. Yamamoto and Q. M. Wang (2004). "The IKK NF-kappa B system: a treasure trove for drug development." Nat Rev Drug Discov **3**(1): 17-26.
- Katta, V., D. T. Chow and M. F. Rohde (1998). "Applications of in-source fragmentation of protein ions for direct sequence analysis by delayed extraction MALDI-TOF mass spectrometry." Anal Chem **70**(20): 4410-6.
- Kauffmann-Zeh, A., P. Rodriguez-Viciano, E. Ulrich, C. Gilbert, P. Coffey, J. Downward and G. Evan (1997). "Suppression of c-Myc-induced apoptosis by Ras signalling through PI(3)K and PKB." Nature **385**(6616): 544-8.
- Kaufmann, R., B. Spengler and F. Lutzenkirchen (1993). "Mass spectrometric sequencing of linear peptides by product-ion analysis in a reflectron time-of-flight mass spectrometer using matrix-assisted laser desorption ionization." Rapid Commun Mass Spectrom **7**(10): 902-10.

- Kennedy, S. G., A. J. Wagner, S. D. Conzen, J. Jordan, A. Bellacosa, P. N. Tsichlis and N. Hay (1997). "The PI 3-kinase/Akt signaling pathway delivers an anti-apoptotic signal." Genes Dev **11**(6): 701-13.
- Khwaja, A., P. Rodriguez-Viciana, S. Wennstrom, P. H. Warne and J. Downward (1997). "Matrix adhesion and Ras transformation both activate a phosphoinositide 3-OH kinase and protein kinase B/Akt cellular survival pathway." Embo J **16**(10): 2783-93.
- Kim, A. H., G. Khursigara, X. Sun, T. F. Franke and M. V. Chao (2001). "Akt phosphorylates and negatively regulates apoptosis signal-regulating kinase 1." Mol Cell Biol **21**(3): 893-901.
- Kimura, K. D., H. A. Tissenbaum, Y. Liu and G. Ruvkun (1997). "daf-2, an insulin receptor-like gene that regulates longevity and diapause in *Caenorhabditis elegans*." Science **277**(5328): 942-6.
- King, C. C., E. M. Gardiner, F. T. Zenke, B. P. Bohl, A. C. Newton, B. A. Hemmings and G. M. Bokoch (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., Y. Kitamura, S. Kuroda, Y. Hino, M. Ando, K. Kotani, H. Konishi, H. Matsuzaki, U. Kikkawa, W. Ogawa and M. Kasuga (1999). "Insulin-induced phosphorylation and activation of cyclic nucleotide phosphodiesterase 3B by the serine-threonine kinase Akt." Mol Cell Biol **19**(9): 6286-96.
- Kitamura, T., W. Ogawa, H. Sakaue, Y. Hino, S. Kuroda, M. Takata, M. Matsumoto, T. Maeda, H. Konishi, U. Kikkawa and M. Kasuga (1998). "Requirement for activation of the serine-threonine kinase Akt (protein kinase B) in insulin stimulation of protein synthesis but not of glucose transport." Mol Cell Biol **18**(7): 3708-17.
- Kjellen, L. and U. Lindahl (1991). "Proteoglycans: structures and interactions." Annu Rev Biochem **60**: 443-75.
- Klippel, A., W. M. Kavanaugh, D. Pot and L. T. Williams (1997). "A specific product of phosphatidylinositol 3-kinase directly activates the protein kinase Akt through its pleckstrin homology domain." Mol Cell Biol **17**(1): 338-44.
- Knabbe, C., M. E. Lippman, L. M. Wakefield, K. C. Flanders, A. Kasid, R. Derynck and R. B. Dickson (1987). "Evidence that transforming growth factor-beta is a hormonally regulated negative growth factor in human breast cancer cells." Cell **48**(3): 417-28.
- Knight, Z. A., B. Schilling, R. H. Row, D. M. Kenski, B. W. Gibson and K. M. Shokat (2003). "Phosphospecific proteolysis for mapping sites of protein phosphorylation." Nat Biotechnol **21**(9): 1047-54.
- Knudson, A. G. (1993). "Antioncogenes and human cancer." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(23): 10914-21.
- Knuefermann, C., Y. Lu, B. Liu, W. Jin, K. Liang, L. Wu, M. Schmidt, G. B. Mills, J. Mendelsohn and Z. Fan (2003). "HER2/PI-3K/Akt activation leads to a multidrug resistance in human breast adenocarcinoma cells." Oncogene **22**(21): 3205-12.
- Kohn, A. D., S. A. Summers, M. J. Birnbaum and R. A. Roth (1996). "Expression of a constitutively active Akt Ser/Thr kinase in 3T3-L1 adipocytes stimulates glucose uptake and glucose transporter 4 translocation." J Biol Chem **271**(49): 31372-8.
- Konishi, H., S. Kuroda, M. Tanaka, H. Matsuzaki, Y. Ono, K. Kameyama, T. Haga and U. Kikkawa (1995). "Molecular cloning and characterization of a new member of the

- RAC protein kinase family: association of the pleckstrin homology domain of three types of RAC protein kinase with protein kinase C subspecies and beta gamma subunits of G proteins." Biochem Biophys Res Commun **216**(2): 526-34.
- Korah, R. M., V. Sysounthone, E. Scheff and R. Wieder (2000). "Intracellular FGF-2 promotes differentiation in T-47D breast cancer cells." Biochem Biophys Res Commun **277**(1): 255-60.
- Korhonen, J. M., F. A. Said, A. J. Wong and D. R. Kaplan (1999). "Gab1 mediates neurite outgrowth, DNA synthesis, and survival in PC12 cells." J Biol Chem **274**(52): 37307-14.
- Kouhara, H., Y. R. Hadari, T. Spivak-Kroizman, J. Schilling, D. Bar-Sagi, I. Lax and J. Schlessinger (1997). "A lipid-anchored Grb2-binding protein that links FGF-receptor activation to the Ras/MAPK signaling pathway." Cell **89**(5): 693-702.
- Krause, E., H. Wenschuh and P. R. Jungblut (1999). "The dominance of arginine-containing peptides in MALDI-derived tryptic mass fingerprints of proteins." Anal Chem **71**(19): 4160-5.
- Kuiper, G. G., E. Enmark, M. Peltö-Huikko, S. Nilsson and J. A. Gustafsson (1996). "Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(12): 5925-30.
- Kulik, G., A. Klippel and M. J. Weber (1997). "Antiapoptotic signalling by the insulin-like growth factor I receptor, phosphatidylinositol 3-kinase, and Akt." Mol Cell Biol **17**(3): 1595-606.
- Kulik, G. and M. J. Weber (1998). "Akt-dependent and -independent survival signaling pathways utilized by insulin-like growth factor I." Mol Cell Biol **18**(11): 6711-8.
- Kurebayashi, J., S. W. McLeskey, M. D. Johnson, M. E. Lippman, R. B. Dickson and F. G. Kern (1993). "Quantitative demonstration of spontaneous metastasis by MCF-7 human breast cancer cells cotransfected with fibroblast growth factor 4 and LacZ." Cancer Res **53**(9): 2178-87.
- Lancaster, J. M., R. Wooster, J. Mangion, C. M. Phelan, C. Cochran, C. Gumbs, S. Seal, R. Barfoot, N. Collins, G. Bignell, S. Patel, R. Hamoudi, C. Larsson, R. W. Wiseman, A. Berchuck, J. D. Iglehart, J. R. Marks, A. Ashworth, M. R. Stratton and P. A. Futreal (1996). "BRCA2 mutations in primary breast and ovarian cancers." Nat Genet **13**(2): 238-40.
- Lauder, A., A. Castellanos and K. Weston (2001). "c-Myb transcription is activated by protein kinase B (PKB) following interleukin 2 stimulation of Tcells and is required for PKB-mediated protection from apoptosis." Mol Cell Biol **21**(17): 5797-805.
- Lawlor, M. A. and D. R. Alessi (2001). "PKB/Akt: a key mediator of cell proliferation, survival and insulin responses?" J Cell Sci **114**(Pt 16): 2903-10.
- Lawlor, M. A. and P. Rotwein (2000). "Insulin-like growth factor-mediated muscle cell survival: central roles for Akt and cyclin-dependent kinase inhibitor p21." Mol Cell Biol **20**(23): 8983-95.
- Lebart, M. C., C. Mejean, C. Roustan and Y. Benyamin (1993). "Further characterization of the alpha-actinin-actin interface and comparison with filamin-binding sites on actin." J Biol Chem **268**(8): 5642-8.

- Lee, J. W. and S. K. Lee (2004). "Mammalian two-hybrid assay for detecting protein-protein interactions in vivo." Methods Mol Biol **261**: 327-36.
- Lee, M. J., S. Thangada, J. H. Paik, G. P. Sapkota, N. Ancellin, S. S. Chae, M. Wu, M. Morales-Ruiz, W. C. Sessa, D. R. Alessi and T. Hla (2001). "Akt-mediated phosphorylation of the G protein-coupled receptor EDG-1 is required for endothelial cell chemotaxis." Mol Cell **8**(3): 693-704.
- Lehmann, W., R. Widmaier and P. Langen (1989). "Response of different mammary epithelial cell lines to a mammary derived growth inhibitor (MDGI)." Biomed Biochim Acta **48**(1): 143-51.
- Lewis, T. S., J. B. Hunt, L. D. Aveline, K. R. Jonscher, D. F. Louie, J. M. Yeh, T. S. Nahreini, K. A. Resing and N. G. Ahn (2000). "Identification of novel MAP kinase pathway signaling targets by functional proteomics and mass spectrometry." Mol Cell **6**(6): 1343-54.
- Leygue, E., H. Dotzlaw, P. H. Watson and L. C. Murphy (1998). "Altered estrogen receptor alpha and beta messenger RNA expression during human breast tumorigenesis." Cancer Res **58**(15): 3197-201.
- Li, A. W., C. K. Too and P. R. Murphy (1996). "The basic fibroblast growth factor (FGF-2) antisense RNA (GFG) is translated into a MutT-related protein in vivo." Biochem Biophys Res Commun **223**(1): 19-23.
- Li, J., H. Steen and S. P. Gygi (2003). "Protein Profiling with Cleavable Isotope-coded Affinity Tag (cICAT) Reagents: The Yeast Salinity Stress Response." Mol Cell Proteomics **2**(11): 1198-204.
- Li, Y., C. Basilico and A. Mansukhani (1994). "Cell transformation by fibroblast growth factors can be suppressed by truncated fibroblast growth factor receptors." Mol Cell Biol **14**(11): 7660-9.
- Li, Z., H. Jiang, W. Xie, Z. Zhang, A. V. Smrcka and D. Wu (2000). "Roles of PLC-beta2 and -beta3 and PI3Kgamma in chemoattractant-mediated signal transduction." Science **287**(5455): 1046-9.
- Lietzke, S. E., S. Bose, T. Cronin, J. Klarlund, A. Chawla, M. P. Czech and D. G. Lambright (2000). "Structural basis of 3-phosphoinositide recognition by pleckstrin homology domains." Mol Cell **6**(2): 385-94.
- Lim, Y. P., C. Y. Wong, L. L. Ooi, B. J. Druker and R. J. Epstein (2004). "Selective tyrosine hyperphosphorylation of cytoskeletal and stress proteins in primary human breast cancers: implications for adjuvant use of kinase-inhibitory drugs." Clin Cancer Res **10**(12 Pt 1): 3980-7.
- Lin, K., H. Hsin, N. Libina and C. Kenyon (2001). "Regulation of the *Caenorhabditis elegans* longevity protein DAF-16 by insulin/IGF-1 and germline signaling." Nat Genet **28**(2): 139-45.
- Liu, M. Y., S. Cai, A. Espejo, M. T. Bedford and C. L. Walker (2002). "14-3-3 interacts with the tumor suppressor tuberlin at Akt phosphorylation site(s)." Cancer Res **62**(22): 6475-80.
- Lynch, D. K. and R. J. Daly (2002). "PKB-mediated negative feedback tightly regulates mitogenic signalling via Gab2." Embo J **21**(1-2): 72-82.

- Ma, Y. Y., S. J. Wei, Y. C. Lin, J. C. Lung, T. C. Chang, J. Whang-Peng, J. M. Liu, D. M. Yang, W. K. Yang and C. Y. Shen (2000). "PIK3CA as an oncogene in cervical cancer." *Oncogene* **19**(23): 2739-44.
- Mackintosh, C. (2004). "Dynamic interactions between 14-3-3 proteins and phosphoproteins regulate diverse cellular processes." *Biochem J* **381**(Pt 2): 329-42.
- Maguire, P. B., K. J. Wynne, D. F. Harney, N. M. O'Donoghue, G. Stephens and D. J. Fitzgerald (2002). "Identification of the phosphotyrosine proteome from thrombin activated platelets." *Proteomics* **2**(6): 642-8.
- Malloy, P. J., W. Zhu, X. Y. Zhao, G. B. Pehling and D. Feldman (2001). "A novel inborn error in the ligand-binding domain of the vitamin D receptor causes hereditary vitamin D-resistant rickets." *Mol Genet Metab* **73**(2): 138-48.
- Mamyrin, B., V. Karataev, D. Shmikk and V. Zagulin (1973). "Mass Reflectron. New non-magnetic time-of-flight high resolution mass spectrometer." *Zh. Eksp. Theor. Fiz.* **64**: 82-89.
- Manetti, F. and M. Botta (2003). "Small-molecule inhibitors of fibroblast growth factor receptor (FGFR) tyrosine kinases (TK)." *Curr Pharm Des* **9**(7): 567-81.
- Mann, M., P. Hojrup and P. Roepstorff (1993). "Use of mass spectrometric molecular weight information to identify proteins in sequence databases." *Biol Mass Spectrom* **22**(6): 338-45.
- Mann, M. and M. Wilm (1995). "Electrospray mass spectrometry for protein characterization." *Trends Biochem Sci* **20**(6): 219-24.
- Manning, B. D., A. R. Tee, M. N. Logsdon, J. Blenis and L. C. Cantley (2002). "Identification of the tuberous sclerosis complex-2 tumor suppressor gene product tuberlin as a target of the phosphoinositide 3-kinase/akt pathway." *Mol Cell* **10**(1): 151-62.
- May, F. E. and B. R. Westley (1995). "Estrogen regulated messenger RNAs in human breast cancer cells." *Biomed Pharmacother* **49**(9): 400-14.
- Mayo, L. D. and D. B. Donner (2001). "A phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway promotes translocation of Mdm2 from the cytoplasm to the nucleus." *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(20): 11598-603.
- Mayo, L. D. and D. B. Donner (2002). "The PTEN, Mdm2, p53 tumor suppressor-oncoprotein network." *Trends Biochem Sci* **27**(9): 462-7.
- McDonald, W. H. and J. R. Yates, 3rd (2003). "Shotgun proteomics: integrating technologies to answer biological questions." *Curr Opin Mol Ther* **5**(3): 302-9.
- McKeehan, W. L. and M. Kan (1994). "Heparan sulfate fibroblast growth factor receptor complex: structure-function relationships." *Mol Reprod Dev* **39**(1): 69-81; discussion 81-2.
- McLeskey, S. W., J. Kurebayashi, S. F. Honig, J. Zwiebel, M. E. Lippman, R. B. Dickson and F. G. Kern (1993). "Fibroblast growth factor 4 transfection of MCF-7 cells produces cell lines that are tumorigenic and metastatic in ovariectomized or tamoxifen-treated athymic nude mice." *Cancer Res* **53**(9): 2168-77.
- McLeskey, S. W., C. A. Tobias, P. R. Vezza, A. C. Filie, F. G. Kern and J. Hanfelt (1998). "Tumor growth of FGF or VEGF transfected MCF-7 breast carcinoma cells correlates with density of specific microvessels independent of the transfected angiogenic factor." *Am J Pathol* **153**(6): 1993-2006.

- McLeskey, S. W., L. Zhang, S. Kharbanda, J. Kurebayashi, M. E. Lippman, R. B. Dickson and F. G. Kern (1996). "Fibroblast growth factor overexpressing breast carcinoma cells as models of angiogenesis and metastasis." Breast Cancer Res Treat **39**(1): 103-17.
- Medema, R. H., G. J. Kops, J. L. Bos and B. M. Burgering (2000). "AFX-like Forkhead transcription factors mediate cell-cycle regulation by Ras and PKB through p27kip1." Nature **404**(6779): 782-7.
- Meier, R., D. R. Alessi, P. Cron, M. Andjelkovic and B. A. Hemmings (1997). "Mitogenic activation, phosphorylation, and nuclear translocation of protein kinase B β ." J Biol Chem **272**(48): 30491-7.
- Mergia, A., R. Eddy, J. A. Abraham, J. C. Fiddes and T. B. Shows (1986). "The genes for basic and acidic fibroblast growth factors are on different human chromosomes." Biochem Biophys Res Commun **138**(2): 644-51.
- Meyer, H. H. (2005). "Golgi reassembly after mitosis: the AAA family meets the ubiquitin family." Biochim Biophys Acta **1744**(3): 481-92.
- Mialhe, A., L. Lafanechere, I. Treilleux, N. Peloux, C. Dumontet, A. Bremond, M. H. Panh, R. Payan, J. Wehland, R. L. Margolis and D. Job (2001). "Tubulin dephosphorylation is a frequent occurrence in breast cancers of poor prognosis." Cancer Res **61**(13): 5024-7.
- Mihaylova, V. T., C. Z. Borland, L. Manjarrez, M. J. Stern and H. Sun (1999). "The PTEN tumor suppressor homolog in *Caenorhabditis elegans* regulates longevity and dauer formation in an insulin receptor-like signaling pathway." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(13): 7427-32.
- Miron, M., J. Verdu, P. E. Lachance, M. J. Birnbaum, P. F. Lasko and N. Sonenberg (2001). "The translational inhibitor 4E-BP is an effector of PI(3)K/Akt signalling and cell growth in *Drosophila*." Nat Cell Biol **3**(6): 596-601.
- Mirza, M. R. (1991). "Anti-estrogen induced synthesis of transforming growth factor- β in breast cancer patients." Cancer Treat Rev **18**(2): 145-8.
- Moffett, J., E. Kratz, J. Myers, E. K. Stachowiak, R. Z. Florkiewicz and M. K. Stachowiak (1998). "Transcriptional regulation of fibroblast growth factor-2 expression in human astrocytes: implications for cell plasticity." Mol Biol Cell **9**(8): 2269-85.
- Mohammadi, M., J. Schlessinger and S. R. Hubbard (1996). "Structure of the FGF receptor tyrosine kinase domain reveals a novel autoinhibitory mechanism." Cell **86**(4): 577-87.
- Montagne, J., M. J. Stewart, H. Stocker, E. Hafen, S. C. Kozma and G. Thomas (1999). "Drosophila S6 kinase: a regulator of cell size." Science **285**(5436): 2126-9.
- Morris, J. Z., H. A. Tissenbaum and G. Ruvkun (1996). "A phosphatidylinositol-3-OH kinase family member regulating longevity and diapause in *Caenorhabditis elegans*." Nature **382**(6591): 536-9.
- Mosselman, S., J. Polman and R. Dijkema (1996). "ER β : identification and characterization of a novel human estrogen receptor." FEBS Lett **392**(1): 49-53.
- Mourez, M. and R. J. Collier (2004). "Use of phage display and polyvalency to design inhibitors of protein-protein interactions." Methods Mol Biol **261**: 213-28.
- Mrowka, R., A. Patzak and H. Herzel (2001). "Is there a bias in proteome research?" Genome Res **11**(12): 1971-3.

- Murphy, M., K. Reid, M. Ford, J. B. Furness and P. F. Bartlett (1994). "FGF2 regulates proliferation of neural crest cells, with subsequent neuronal differentiation regulated by LIF or related factors." Development **120**(12): 3519-28.
- Murphy, P. R., M. Limoges, F. Dodd, R. T. Boudreau and C. K. Too (2001). "Fibroblast growth factor-2 stimulates endothelial nitric oxide synthase expression and inhibits apoptosis by a nitric oxide-dependent pathway in Nb2 lymphoma cells." Endocrinology **142**(1): 81-8.
- Nakamura, T., K. Matsumoto, A. Kiritoshi and Y. Tano (1997). "Induction of hepatocyte growth factor in fibroblasts by tumor-derived factors affects invasive growth of tumor cells: in vitro analysis of tumor-stromal interactions." Cancer Res **57**(15): 3305-13.
- Nakatani, K., H. Sakaue, D. A. Thompson, R. J. Weigel and R. A. Roth (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.
- Naot, D., R. Sionov and D. Ish-Shalom (1997). "CD44: Structure, Functions and Association with the Malignant Process." Adv. Cancer Res. **71**: 241-319.
- Ng, S. S. W., M. S. Tsao, S. Chow and D. W. Hedley (2000). "Inhibition of phosphatidylinositide 3-kinase enhances gemcitabine-induced apoptosis in human pancreatic cancer cells." Cancer Res **60**(19): 5451-5.
- Nicholson, K. M., C. H. Streuli and N. G. Anderson (2003). "Autocrine signalling through erbB receptors promotes constitutive activation of protein kinase B/Akt in breast cancer cell lines." Breast Cancer Res Treat **81**(2): 117-28.
- Nurcombe, V., C. E. Smart, H. Chipperfield, S. M. Cool, B. Boilly and H. Hondermarck (2000). "The proliferative and migratory activities of breast cancer cells can be differentially regulated by heparan sulfates." J Biol Chem **275**(39): 30009-18.
- Obata, T., M. B. Yaffe, G. G. Leparo, E. T. Piro, H. Maegawa, A. Kashiwagi, R. Kikkawa and L. C. Cantley (2000). "Peptide and protein library screening defines optimal substrate motifs for AKT/PKB." J Biol Chem **275**(46): 36108-15.
- Oda, Y., T. Nagasu and B. T. Chait (2001). "Enrichment analysis of phosphorylated proteins as a tool for probing the phosphoproteome." Nat Biotechnol **19**(4): 379-82.
- O'Gorman, D. M., S. L. McKenna, A. J. McGahon and T. G. Cotter (2001). "Inhibition of PI3-kinase sensitises HL60 human leukaemia cells to both chemotherapeutic drug- and Fas-induced apoptosis by a JNK independent pathway." Leuk Res **25**(9): 801-11.
- Okada-Ban, M., J. P. Thiery and J. Jouanneau (2000). "Fibroblast growth factor-2." Int J Biochem Cell Biol **32**(3): 263-7.
- Oki, E., H. Baba, E. Tokunaga, T. Nakamura, N. Ueda, M. Futatsugi, K. Mashino, M. Yamamoto, M. Ikebe, Y. Kakeji and Y. Maehara (2005). "Akt phosphorylation associates with LOH of PTEN and leads to chemoresistance for gastric cancer." Int J Cancer.
- Ong, S. E., L. J. Foster and M. Mann (2003). "Mass spectrometric-based approaches in quantitative proteomics." Methods **29**(2): 124-30.
- Ong, S. H., K. C. Goh, Y. P. Lim, B. C. Low, P. Klint, L. Claesson-Welsh, X. Cao, Y. H. Tan and G. R. Guy (1996). "Snc1-associated neurotrophic factor target (SNT) protein is a

- major FGF-stimulated tyrosine phosphorylated 90-kDa protein which binds to the SH2 domain of GRB2." Biochem Biophys Res Commun **225**(3): 1021-6.
- Ong, S. H., G. R. Guy, Y. R. Hadari, S. Laks, N. Gotoh, J. Schlessinger and I. Lax (2000). "FRS2 proteins recruit intracellular signaling pathways by binding to diverse targets on fibroblast growth factor and nerve growth factor receptors." Mol Cell Biol **20**(3): 979-89.
- Ong, S. H., Y. R. Hadari, N. Gotoh, G. R. Guy, J. Schlessinger and I. Lax (2001). "Stimulation of phosphatidylinositol 3-kinase by fibroblast growth factor receptors is mediated by coordinated recruitment of multiple docking proteins." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(11): 6074-9.
- Oren, M. (2003). "Decision making by p53: life, death and cancer." Cell Death Differ **10**(4): 431-42.
- Ornitz, D. M. and N. Itoh (2001). "Fibroblast growth factors." Genome Biol **2**(3): REVIEWS3005.
- Osborne, C. K., E. B. Coronado, L. J. Kitten, C. I. Arteaga, S. A. Fuqua, K. Ramasharma, M. Marshall and C. H. Li (1989). "Insulin-like growth factor-II (IGF-II): a potential autocrine/paracrine growth factor for human breast cancer acting via the IGF-I receptor." Mol Endocrinol **3**(11): 1701-9.
- Ozes, O. N., L. D. Mayo, J. A. Gustin, S. R. Pfeffer, L. M. Pfeffer and D. B. Donner (1999). "NF-kappaB activation by tumour necrosis factor requires the Akt serine-threonine kinase." Nature **401**(6748): 82-5.
- Padera, R., G. Venkataraman, D. Berry, R. Godavarti and R. Sasisekharan (1999). "FGF-2/fibroblast growth factor receptor/heparin-like glycosaminoglycan interactions: a compensation model for FGF-2 signaling." Faseb J **13**(13): 1677-87.
- Page, C., H. J. Lin, Y. Jin, V. P. Castle, G. Nunez, M. Huang and J. Lin (2000). "Overexpression of Akt/AKT can modulate chemotherapy-induced apoptosis." Anticancer Res **20**(1A): 407-16.
- Palamarchuk, A., A. Efanov, V. Maximov, R. I. Aqeilan, C. M. Croce and Y. Pekarsky (2005). "Akt phosphorylates Tal1 oncoprotein and inhibits its repressor activity." Cancer Res **65**(11): 4515-9.
- Pap, M. and G. M. Cooper (1998). "Role of glycogen synthase kinase-3 in the phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt cell survival pathway." J Biol Chem **273**(32): 19929-32.
- Papakonstanti, E. A. and C. Stournaras (2002). "Association of PI-3 kinase with PAK1 leads to actin phosphorylation and cytoskeletal reorganization." Mol Biol Cell **13**(8): 2946-62.
- Paradis, S., M. Ailion, A. Toker, J. H. Thomas and G. Ruvkun (1999). "A PDK1 homolog is necessary and sufficient to transduce AGE-1 PI3 kinase signals that regulate diapause in *Caenorhabditis elegans*." Genes Dev **13**(11): 1438-52.
- Paradis, S. and G. Ruvkun (1998). "*Caenorhabditis elegans* Akt/PKB transduces insulin receptor-like signals from AGE-1 PI3 kinase to the DAF-16 transcription factor." Genes Dev **12**(16): 2488-98.
- Pardo, O. E., A. Arcaro, G. Salerno, S. Raguz, J. Downward and M. J. Seckl (2002). "Fibroblast growth factor-2 induces translational regulation of Bcl-XL and Bcl-2 via a

- MEK-dependent pathway: correlation with resistance to etoposide-induced apoptosis." J Biol Chem **277**(14): 12040-6.
- Park, H. S., M. S. Kim, S. H. Huh, J. Park, J. Chung, S. S. Kang and E. J. Choi (2002). "Akt (protein kinase B) negatively regulates SEK1 by means of protein phosphorylation." J Biol Chem **277**(4): 2573-8.
- Parker, K. C., D. Patterson, B. Williamson, J. Marchese, A. Graber, F. He, A. Jacobson, P. Juhasz and S. Martin (2004). "Depth of proteome issues: a yeast isotope-coded affinity tag reagent study." Mol Cell Proteomics **3**(7): 625-59.
- Pekarsky, Y., C. Hallas, A. Palamarchuk, A. Koval, F. Bullrich, Y. Hirata, R. Bichi, J. Letofsky and C. M. Croce (2001). "Akt phosphorylates and regulates the orphan nuclear receptor Nur77." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(7): 3690-4.
- Peterson, R. T. and S. L. Schreiber (1999). "Kinase phosphorylation: Keeping it all in the family." Curr Biol **9**(14): R521-4.
- Peyrat, J. P., J. Bonnetterre, B. Hecquet, P. Vennin, M. M. Louchez, C. Fournier, J. Lefebvre and A. Demaille (1993). "Plasma insulin-like growth factor-1 (IGF-1) concentrations in human breast cancer." Eur J Cancer **29A**(4): 492-7.
- Peyrat, J. P., J. Bonnetterre, P. H. Vennin, H. Jammes, R. Beuscart, B. Hecquet, J. Djiane, J. Lefebvre and A. Demaille (1990). "Insulin-like growth factor 1 receptors (IGF1-R) and IGF1 in human breast tumors." J Steroid Biochem Mol Biol **37**(6): 823-7.
- Peyrat, J. P., L. Vanlemmens, J. Fournier, G. Huet, F. Revillion and J. Bonnetterre (1998). "Prognostic value of p53 and urokinase-type plasminogen activator in node-negative human breast cancers." Clin Cancer Res **4**(1): 189-96.
- Philpott, K. L., M. J. McCarthy, A. Klippel and L. L. Rubin (1997). "Activated phosphatidylinositol 3-kinase and Akt kinase promote survival of superior cervical neurons." J Cell Biol **139**(3): 809-15.
- Podsypanina, K., L. H. Ellenson, A. Nemes, J. Gu, M. Tamura, K. M. Yamada, C. Cordon-Cardo, G. Catoretti, P. E. Fisher and R. Parsons (1999). "Mutation of Pten/Mmac1 in mice causes neoplasia in multiple organ systems." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(4): 1563-8.
- Polnaszek, N., B. Kwabi-Addo, L. E. Peterson, M. Ozen, N. M. Greenberg, S. Ortega, C. Basilico and M. Ittmann (2003). "Fibroblast growth factor 2 promotes tumor progression in an autochthonous mouse model of prostate cancer." Cancer Res **63**(18): 5754-60.
- Popovici, C., R. Roubin, F. Coulier and D. Birnbaum (2005). "An evolutionary history of the FGF superfamily." Bioessays **27**(8): 849-57.
- Posewitz, M. C. and P. Tempst (1999). "Immobilized gallium(III) affinity chromatography of phosphopeptides." Anal Chem **71**(14): 2883-92.
- Potter, C. J., L. G. Pedraza and T. Xu (2002). "Akt regulates growth by directly phosphorylating Tsc2." Nat Cell Biol **4**(9): 658-65.
- Poustovoitov, M., I. Serebriiskii and P. D. Adams (2004). "A two-step two-hybrid system to identify functionally significant protein-protein interactions." Methods **32**(4): 371-80.
- Prats, A. C., S. Vagner, H. Prats and F. Amalric (1992). "cis-acting elements involved in the alternative translation initiation process of human basic fibroblast growth factor mRNA." Mol Cell Biol **12**(10): 4796-805.

- Presta, M., M. Rusnati, P. Dell'Era, E. Tanghetti, C. Urbinati, R. Giuliani and D. Leali (2000). "Examining new models for the study of autocrine and paracrine mechanisms of angiogenesis through FGF2-transfected endothelial and tumour cells." Adv Exp Med Biol **476**: 7-34.
- Puig, O., F. Caspary, G. Rigaut, B. Rutz, E. Bouveret, E. Bragado-Nilsson, M. Wilm and B. Seraphin (2001). "The tandem affinity purification (TAP) method: a general procedure of protein complex purification." Methods **24**(3): 218-29.
- Qian, W. J., M. B. Goshe, D. G. Camp, 2nd, L. R. Yu, K. Tang and R. D. Smith (2003). "Phosphoprotein isotope-coded solid-phase tag approach for enrichment and quantitative analysis of phosphopeptides from complex mixtures." Anal Chem **75**(20): 5441-50.
- Qian, X., T. Karpova, A. M. Sheppard, J. McNally and D. R. Lowy (2004). "E-cadherin-mediated adhesion inhibits ligand-dependent activation of diverse receptor tyrosine kinases." Embo J **23**(8): 1739-48.
- Rahmoune, H., H. L. Chen, J. T. Gallagher, P. S. Rudland and D. G. Fernig (1998). "Interaction of heparan sulfate from mammary cells with acidic fibroblast growth factor (FGF) and basic FGF. Regulation of the activity of basic FGF by high and low affinity binding sites in heparan sulfate." J Biol Chem **273**(13): 7303-10.
- Rathmell, J. C., C. J. Fox, D. R. Plas, P. S. Hammerman, R. M. Cinalli and C. B. Thompson (2003). "Akt-directed glucose metabolism can prevent Bax conformation change and promote growth factor-independent survival." Mol Cell Biol **23**(20): 7315-28.
- Rathmell, J. C., M. G. Vander Heiden, M. H. Harris, K. A. Frauwirth and C. B. Thompson (2000). "In the absence of extrinsic signals, nutrient utilization by lymphocytes is insufficient to maintain either cell size or viability." Mol Cell **6**(3): 683-92.
- Resing, K. A., K. Meyer-Arendt, A. M. Mendoza, L. D. Aveline-Wolf, K. R. Jonscher, K. G. Pierce, W. M. Old, H. T. Cheung, S. Russell, J. L. Wattawa, G. R. Goehle, R. D. Knight and N. G. Ahn (2004). "Improving reproducibility and sensitivity in identifying human proteins by shotgun proteomics." Anal Chem **76**(13): 3556-68.
- Revillion, F., J. Bonnetterre and J. P. Peyrat (1998). "ERBB2 oncogene in human breast cancer and its clinical significance." Eur J Cancer **34**(6): 791-808.
- Rigaut, G., A. Shevchenko, B. Rutz, M. Wilm, M. Mann and B. Seraphin (1999). "A generic protein purification method for protein complex characterization and proteome exploration." Nat Biotechnol **17**(10): 1030-2.
- Robert, P., P. Tsui, M. P. Laville, G. P. Livi, H. M. Sarau, A. Bril and I. Berrebi-Bertrand (2001). "EDG1 receptor stimulation leads to cardiac hypertrophy in rat neonatal myocytes." J Mol Cell Cardiol **33**(9): 1589-606.
- Rocheftort, H. (1992). "Biological and clinical significance of cathepsin D in breast cancer." Acta Oncol **31**(2): 125-30.
- Rocheftort, H., D. Chalbos, S. Cunat, A. Lucas, N. Platet and M. Garcia (2001). "Estrogen regulated proteases and antiproteases in ovarian and breast cancer cells." J Steroid Biochem Mol Biol **76**(1-5): 119-24.
- Roder, K. and M. Schweizer (2001). "Running-buffer composition influences DNA-protein and protein-protein complexes detected by electrophoretic mobility-shift assay (EMSA)." Biotechnol Appl Biochem **33**(Pt 3): 209-14.

- Rodrigues, G. A., M. Falasca, Z. Zhang, S. H. Ong and J. Schlessinger (2000). "A novel positive feedback loop mediated by the docking protein Gab1 and phosphatidylinositol 3-kinase in epidermal growth factor receptor signaling." *Mol Cell Biol* **20**(4): 1448-59.
- Rodriguez-Viciana, P., P. H. Warne, A. Khwaja, B. M. Marte, D. Pappin, P. Das, M. D. Waterfield, A. Ridley and J. Downward (1997). "Role of phosphoinositide 3-OH kinase in cell transformation and control of the actin cytoskeleton by Ras." *Cell* **89**(3): 457-67.
- Roepstorff, P. and J. Fohlman (1984). "Proposal for a common nomenclature for sequence ions in mass spectra of peptides." *Biomed Mass Spectrom* **11**(11): 601.
- Rohn, J. L., A. O. Hueber, N. J. McCarthy, D. Lyon, P. Navarro, B. M. Burgering and G. I. Evan (1998). "The opposing roles of the Akt and c-Myc signalling pathways in survival from CD95-mediated apoptosis." *Oncogene* **17**(22): 2811-8.
- Romashkova, J. A. and S. S. Makarov (1999). "NF-kappaB is a target of AKT in anti-apoptotic PDGF signalling." *Nature* **401**(6748): 86-90.
- Rossig, L., A. S. Jadidi, C. Urbich, C. Badorff, A. M. Zeiher and S. Dimmeler (2001). "Akt-dependent phosphorylation of p21(Cip1) regulates PCNA binding and proliferation of endothelial cells." *Mol Cell Biol* **21**(16): 5644-57.
- Rountree, M. R., K. E. Bachman, J. G. Herman and S. B. Baylin (2001). "DNA methylation, chromatin inheritance, and cancer." *Oncogene* **20**(24): 3156-65.
- Ruggeri, B. A., L. Huang, M. Wood, J. Q. Cheng and J. R. Testa (1998). "Amplification and overexpression of the AKT2 oncogene in a subset of human pancreatic ductal adenocarcinomas." *Mol Carcinog* **21**(2): 81-6.
- Sable, C. L., N. Filippa, C. Filloux, B. A. Hemmings and E. Van Obberghen (1998). "Involvement of the pleckstrin homology domain in the insulin-stimulated activation of protein kinase B." *J Biol Chem* **273**(45): 29600-6.
- Sable, C. L., N. Filippa, B. Hemmings and E. Van Obberghen (1997). "cAMP stimulates protein kinase B in a Wortmannin-insensitive manner." *FEBS Lett* **409**(2): 253-7.
- Saltiel, A. R. and C. R. Kahn (2001). "Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism." *Nature* **414**(6865): 799-806.
- Sandhu, C., J. Donovan, N. Bhattacharya, M. Stampfer, P. Worland and J. Slingerland (2000). "Reduction of Cdc25A contributes to cyclin E1-Cdk2 inhibition at senescence in human mammary epithelial cells." *Oncogene* **19**(47): 5314-23.
- Sarbassov, D. D., D. A. Guertin, S. M. Ali and D. M. Sabatini (2005). "Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex." *Science* **307**(5712): 1098-101.
- Sasaki, T., J. Irie-Sasaki, Y. Horie, K. Bachmaier, J. E. Fata, M. Li, A. Suzuki, D. Bouchard, A. Ho, M. Redston, S. Gallinger, R. Khokha, T. W. Mak, P. T. Hawkins, L. Stephens, S. W. Scherer, M. Tsao and J. M. Penninger (2000). "Colorectal carcinomas in mice lacking the catalytic subunit of PI(3)Kgamma." *Nature* **406**(6798): 897-902.
- Sasaki, T., J. Irie-Sasaki, R. G. Jones, A. J. Oliveira-dos-Santos, W. L. Stanford, B. Bolon, A. Wakeham, A. Itie, D. Bouchard, I. Kozieradzki, N. Joza, T. W. Mak, P. S. Ohashi, A. Suzuki and J. M. Penninger (2000). "Function of PI3Kgamma in thymocyte development, T cell activation, and neutrophil migration." *Science* **287**(5455): 1040-6.

- Schaeper, U., N. H. Gehring, K. P. Fuchs, M. Sachs, B. Kempkes and W. Birchmeier (2000). "Coupling of Gab1 to c-Met, Grb2, and Shp2 mediates biological responses." J Cell Biol **149**(7): 1419-32.
- Schagger, H., W. A. Cramer and G. von Jagow (1994). "Analysis of molecular masses and oligomeric states of protein complexes by blue native electrophoresis and isolation of membrane protein complexes by two-dimensional native electrophoresis." Anal Biochem **217**(2): 220-30.
- Schagger, H. and G. von Jagow (1991). "Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form." Anal Biochem **199**(2): 223-31.
- Schamel, W. W. and M. Reth (2000). "Monomeric and oligomeric complexes of the B cell antigen receptor." Immunity **13**(1): 5-14.
- Schmidt, C., V. Wilson, D. Stott and R. S. Beddington (1997). "T promoter activity in the absence of functional T protein during axis formation and elongation in the mouse." Dev Biol **189**(2): 161-73.
- Shayesteh, L., Y. Lu, W. L. Kuo, R. Baldocchi, T. Godfrey, C. Collins, D. Pinkel, B. Powell, G. B. Mills and J. W. Gray (1999). "PIK3CA is implicated as an oncogene in ovarian cancer." Nat Genet **21**(1): 99-102.
- Shi, E., M. Kan, J. Xu, F. Wang, J. Hou and W. L. McKeehan (1993). "Control of fibroblast growth factor receptor kinase signal transduction by heterodimerization of combinatorial splice variants." Mol Cell Biol **13**(7): 3907-18.
- Shibata, F., A. Baird and R. Z. Florkiewicz (1991). "Functional characterization of the human basic fibroblast growth factor gene promoter." Growth Factors **4**(4): 277-87.
- Shiio, Y., S. Donohoe, E. C. Yi, D. R. Goodlett, R. Aebersold and R. N. Eisenman (2002). "Quantitative proteomic analysis of Myc oncoprotein function." Embo J **21**(19): 5088-96.
- Shimizu, H. and T. R. Hupp (2003). "Intrasteric regulation of MDM2." Trends Biochem Sci **28**(7): 346-9.
- Shioi, T., P. M. Kang, P. S. Douglas, J. Hampe, C. M. Yballe, J. Lawitts, L. C. Cantley and S. Izumo (2000). "The conserved phosphoinositide 3-kinase pathway determines heart size in mice." Embo J **19**(11): 2537-48.
- Shioi, T., J. R. McMullen, P. M. Kang, P. S. Douglas, T. Obata, T. F. Franke, L. C. Cantley and S. Izumo (2002). "Akt/protein kinase B promotes organ growth in transgenic mice." Mol Cell Biol **22**(8): 2799-809.
- Shmueli, O., S. Horn-Saban, V. Chalifa-Caspi, M. Shmoish, R. Ophir, H. Benjamin-Rodrig, M. Safran, E. Domany and D. Lancet (2003). "GeneNote: whole genome expression profiles in normal human tissues." C R Biol **326**(10-11): 1067-72.
- Shu, H., S. Chen, Q. Bi, M. Mumby and D. L. Brekken (2004). "Identification of phosphoproteins and their phosphorylation sites in the WEHI-231 B lymphoma cell line." Mol Cell Proteomics **3**(3): 279-86.
- Simpson, L. and R. Parsons (2001). "PTEN: life as a tumor suppressor." Exp Cell Res **264**(1): 29-41.

- Snyder, J. P., J. H. Nettles, B. Cornett, K. H. Downing and E. Nogales (2001). "The binding conformation of Taxol in beta-tubulin: a model based on electron crystallographic density." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(9): 5312-6.
- Songyang, Z., D. Baltimore, L. C. Cantley, D. R. Kaplan and T. F. Franke (1997). "Interleukin 3-dependent survival by the Akt protein kinase." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(21): 11345-50.
- Sorokin, A., M. Mohammadi, J. Huang and J. Schlessinger (1994). "Internalization of fibroblast growth factor receptor is inhibited by a point mutation at tyrosine 766." J Biol Chem **269**(25): 17056-61.
- Soskic, V., M. Gorlach, S. Poznanovic, F. D. Boehmer and J. Godovac-Zimmermann (1999). "Functional proteomics analysis of signal transduction pathways of the platelet-derived growth factor beta receptor." Biochemistry **38**(6): 1757-64.
- Souttou, B., C. Gamby, M. Crepin and R. Hamelin (1996). "Tumoral progression of human breast epithelial cells secreting FGF2 and FGF4." Int J Cancer **68**(5): 675-81.
- Sreekumar, A., M. K. Nyati, S. Varambally, T. R. Barrette, D. Ghosh, T. S. Lawrence and A. M. Chinnaiyan (2001). "Profiling of cancer cells using protein microarrays: discovery of novel radiation-regulated proteins." Cancer Res **61**(20): 7585-93.
- 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., J. W. Hartley and W. P. Rowe (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.
- Stambolic, V., A. Suzuki, J. L. de la Pompa, G. M. Brothers, C. Mirtsos, T. Sasaki, J. Ruland, J. M. Penninger, D. P. Siderovski and T. W. Mak (1998). "Negative regulation of PKB/Akt-dependent cell survival by the tumor suppressor PTEN." Cell **95**(1): 29-39.
- Stambolic, V., M. S. Tsao, D. Macpherson, A. Suzuki, W. B. Chapman and T. W. Mak (2000). "High incidence of breast and endometrial neoplasia resembling human Cowden syndrome in pten^{+/-} mice." Cancer Res **60**(13): 3605-11.
- Stevens, A. (1992). "Histologie."
- Stokoe, D., L. R. Stephens, T. Copeland, P. R. Gaffney, C. B. Reese, G. F. Painter, A. B. Holmes, F. McCormick and P. T. Hawkins (1997). "Dual role of phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate in the activation of protein kinase B." Science **277**(5325): 567-70.
- Su, A. I., M. P. Cooke, K. A. Ching, Y. Hakak, J. R. Walker, T. Wiltshire, A. P. Orth, R. G. Vega, L. M. Sapinoso, A. Moqrich, A. Patapoutian, G. M. Hampton, P. G. Schultz and J. B. Hogenesch (2002). "Large-scale analysis of the human and mouse transcriptomes." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(7): 4465-70.
- Sun, M., J. E. Paciga, R. I. Feldman, Z. Yuan, D. Coppola, Y. Y. Lu, S. A. Shelley, S. V. Nicosia and J. Q. Cheng (2001). "Phosphatidylinositol-3-OH Kinase (PI3K)/AKT2, activated in breast cancer, regulates and is induced by estrogen receptor alpha (ERalpha) via interaction between ERalpha and PI3K." Cancer Res **61**(16): 5985-91.
- Sun, M., G. Wang, J. E. Paciga, R. I. Feldman, Z. Q. Yuan, X. L. Ma, S. A. Shelley, R. Jove, P. N. Tsichlis, S. V. Nicosia and J. Q. Cheng (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.
- Suyama, K., I. Shapiro, M. Guttman and R. B. Hazan (2002). "A signaling pathway leading to metastasis is controlled by N-cadherin and the FGF receptor." Cancer Cell **2**(4): 301-14.
- Suzuki, A., J. L. de la Pompa, V. Stambolic, A. J. Elia, T. Sasaki, I. del Barco Barrantes, A. Ho, A. Wakeham, A. Itie, W. Khoo, M. Fukumoto and T. W. Mak (1998). "High cancer susceptibility and embryonic lethality associated with mutation of the PTEN tumor suppressor gene in mice." Curr Biol **8**(21): 1169-78.
- Suzuki, H., Y. Terauchi, M. Fujiwara, S. Aizawa, Y. Yazaki, T. Kadowaki and S. Koyasu (1999). "Xid-like immunodeficiency in mice with disruption of the p85alpha subunit of phosphoinositide 3-kinase." Science **283**(5400): 390-2.
- Tanaka, K., H. Waki, Y. Ido, S. Akita, Y. Yoshida and T. Yoshida (1988). "Protein and polymer analysis up to m/z 100.000 by laser ionization time-of-flight mass spectrometry." Rapid Commun. Mass Spectrom. **2**: 151-152.
- Tanaka, M. and H. B. Grossman (2003). "In vivo gene therapy of human bladder cancer with PTEN suppresses tumor growth, downregulates phosphorylated Akt, and increases sensitivity to doxorubicin." Gene Ther **10**(19): 1636-42.
- Tee, A. R., D. C. Fingar, B. D. Manning, D. J. Kwiatkowski, L. C. Cantley and J. Blenis (2002). "Tuberous sclerosis complex-1 and -2 gene products function together to inhibit mammalian target of rapamycin (mTOR)-mediated downstream signaling." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(21): 13571-6.
- Teng, D. H., R. Hu, H. Lin, T. Davis, D. Iliev, C. Frye, B. Swedlund, K. L. Hansen, V. L. Vinson, K. L. Gumpfer, L. Ellis, A. El-Naggar, M. Frazier, S. Jasser, L. A. Langford, J. Lee, G. B. Mills, M. A. Pershouse, R. E. Pollack, C. Tornos, P. Troncoso, W. K. Yung, G. Fujii, A. Berson, P. A. Steck and et al. (1997). "MMAC1/PTEN mutations in primary tumor specimens and tumor cell lines." Cancer Res **57**(23): 5221-5.
- Terauchi, Y., Y. Tsuji, S. Satoh, H. Minoura, K. Murakami, A. Okuno, K. Inukai, T. Asano, Y. Kaburagi, K. Ueki, H. Nakajima, T. Hanafusa, Y. Matsuzawa, H. Sekihara, Y. Yin, J. C. Barrett, H. Oda, T. Ishikawa, Y. Akanuma, I. Komuro, M. Suzuki, K. Yamamura, T. Kodama, H. Suzuki, S. Koyasu, S. Aizawa, K. Tobe, Y. Fukui, Y. Yazaki and T. Kadowaki (1999). "Increased insulin sensitivity and hypoglycaemia in mice lacking the p85 alpha subunit of phosphoinositide 3-kinase." Nat Genet **21**(2): 230-5.
- Tewari, M., P. J. Hu, J. S. Ahn, N. Ayivi-Guedehoussou, P. O. Vidalain, S. Li, S. Milstein, C. M. Armstrong, M. Boxem, M. D. Butler, S. Busiguina, J. F. Rual, N. Ibarrola, S. T. Chaklos, N. Bertin, P. Vaglio, M. L. Edgley, K. V. King, P. S. Albert, J. Vandenhaute, A. Pandey, D. L. Riddle, G. Ruvkun and M. Vidal (2004). "Systematic interactome mapping and genetic perturbation analysis of a C. elegans TGF-beta signaling network." Mol Cell **13**(4): 469-82.
- Thomas, C. C., M. Deak, D. R. Alessi and D. M. van Aalten (2002). "High-resolution structure of the pleckstrin homology domain of protein kinase b/akt bound to phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate." Curr Biol **12**(14): 1256-62.
- Thomas, T., M. A. Gallo and T. J. Thomas (2004). "Estrogen receptors as targets for drug development for breast cancer, osteoporosis and cardiovascular diseases." Curr Cancer Drug Targets **4**(6): 483-99.

- Thompson, D. and D. Easton (2004). "The genetic epidemiology of breast cancer genes." J Mammary Gland Biol Neoplasia **9**(3): 221-36.
- Thornberry, N. A. (1998). "Caspases: key mediators of apoptosis." Chem Biol **5**(5): R97-103.
- Tlsty, T. D., Y. G. Crawford, C. R. Holst, C. A. Fordyce, J. Zhang, K. McDermott, K. Kozakiewicz and M. L. Gauthier (2004). "Genetic and epigenetic changes in mammary epithelial cells may mimic early events in carcinogenesis." J Mammary Gland Biol Neoplasia **9**(3): 263-74.
- Toby, G. G. and E. A. Golemis (2001). "Using the yeast interaction trap and other two-hybrid-based approaches to study protein-protein interactions." Methods **24**(3): 201-17.
- Toi, M., T. Taniguchi, T. Ueno, M. Asano, N. Funata, K. Sekiguchi, H. Iwanari and T. Tominaga (1998). "Significance of circulating hepatocyte growth factor level as a prognostic indicator in primary breast cancer." Clin Cancer Res **4**(3): 659-64.
- Toker, A. (1998). "The synthesis and cellular roles of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate." Curr Opin Cell Biol **10**(2): 254-61.
- Tokunaga, E., Y. Kimura, E. Oki, N. Ueda, M. Futatsugi, K. Mashino, M. Yamamoto, M. Ikebe, Y. Kakeji, H. Baba and Y. Maehara (2005). "Akt is frequently activated in HER2/neu-positive breast cancers and associated with poor prognosis among hormone-treated patients." Int J Cancer.
- Tsihlias, J., L. Kapusta and J. Slingerland (1999). "The prognostic significance of altered cyclin-dependent kinase inhibitors in human cancer." Annu Rev Med **50**: 401-23.
- Tuttle, R. L., N. S. Gill, W. Pugh, J. P. Lee, B. Koeberlein, E. E. Furth, K. S. Polonsky, A. Naji and M. J. Birnbaum (2001). "Regulation of pancreatic beta-cell growth and survival by the serine/threonine protein kinase Akt1/PKBalpha." Nat Med **7**(10): 1133-7.
- Tyers, M., R. J. Haslam, R. A. Rachubinski and C. B. Harley (1989). "Molecular analysis of pleckstrin: the major protein kinase C substrate of platelets." J Cell Biochem **40**(2): 133-45.
- Uetz, P., L. Giot, G. Cagney, T. A. Mansfield, R. S. Judson, J. R. Knight, D. Lockshon, V. Narayan, M. Srinivasan, P. Pochart, A. Qureshi-Emili, Y. Li, B. Godwin, D. Conover, T. Kalbfleisch, G. Vijayadamodar, M. Yang, M. Johnston, S. Fields and J. M. Rothberg (2000). "A comprehensive analysis of protein-protein interactions in *Saccharomyces cerevisiae*." Nature **403**(6770): 623-7.
- Vander Heiden, M. G., D. R. Plas, J. C. Rathmell, C. J. Fox, M. H. Harris and C. B. Thompson (2001). "Growth factors can influence cell growth and survival through effects on glucose metabolism." Mol Cell Biol **21**(17): 5899-912.
- Vandermoere, F., I. El Yazidi-Belkoura, E. Adriaenssens, J. Lemoine and H. Hondermarck (2005). "The antiapoptotic effect of fibroblast growth factor-2 is mediated through nuclear factor-kappaB activation induced via interaction between Akt and IkappaB kinase-beta in breast cancer cells." Oncogene.
- Vemuri, G. S. and S. E. Rittenhouse (1994). "Wortmannin inhibits serum-induced activation of phosphoinositide 3-kinase and proliferation of CHRF-288 cells." Biochem Biophys Res Commun **202**(3): 1619-23.

- Vercoutter-Edouart, A., J. Lemoine, C. E. Smart, V. Nurcombe, B. Boilly, J. Peyrat and H. Hondermarck (2000). "The mitogenic signaling pathway for fibroblast growth factor-2 involves the tyrosine phosphorylation of cyclin D2 in MCF-7 human breast cancer cells." FEBS Lett **478**(3): 209-15.
- Vercoutter-Edouart, A. S., J. Lemoine, X. Le Bourhis, H. Louis, B. Boilly, V. Nurcombe, F. Revillion, J. P. Peyrat and H. Hondermarck (2001). "Proteomic analysis reveals that 14-3-3sigma is down-regulated in human breast cancer cells." Cancer Res **61**(1): 76-80.
- Verdu, J., M. A. Buratovich, E. L. Wilder and M. J. Birnbaum (1999). "Cell-autonomous regulation of cell and organ growth in Drosophila by Akt/PKB." Nat Cell Biol **1**(8): 500-6.
- Verentchikov, A. N., W. Ens and K. G. Standing (1994). "Reflecting time-of-flight mass spectrometer with an electrospray ion source and orthogonal extraction." Anal Chem **66**(1): 126-33.
- Viglietto, G., M. L. Motti, P. Bruni, R. M. Melillo, A. D'Alessio, D. Califano, F. Vinci, G. Chiappetta, P. Tschlis, A. Bellacosa, A. Fusco and M. Santoro (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.
- Villafuerte, B. C., L. S. Phillips, M. J. Rane and W. Zhao (2004). "Insulin-response element-binding protein 1: a novel Akt substrate involved in transcriptional action of insulin." J Biol Chem **279**(35): 36650-9.
- Vogel, C. L., J. C. Reddy and L. M. Reyno (2005). "Efficacy of trastuzumab." Cancer Res **65**(5): 2044.
- Volk, R., M. Koster, A. Poting, L. Hartmann and W. Knochel (1989). "An antisense transcript from the *Xenopus laevis* bFGF gene coding for an evolutionarily conserved 24 kd protein." Embo J **8**(10): 2983-8.
- Wang, F., M. Kan, K. McKeenan, J. H. Jang, S. Feng and W. L. McKeenan (1997). "A homeo-interaction sequence in the ectodomain of the fibroblast growth factor receptor." J Biol Chem **272**(38): 23887-95.
- Wang, T. C., R. D. Cardiff, L. Zukerberg, E. Lees, A. Arnold and E. V. Schmidt (1994). "Mammary hyperplasia and carcinoma in MMTV-cyclin D1 transgenic mice." Nature **369**(6482): 669-71.
- Ward, C. W., K. H. Gough, M. Rashke, S. S. Wan, G. Tribbick and J. Wang (1996). "Systematic mapping of potential binding sites for Shc and Grb2 SH2 domains on insulin receptor substrate-1 and the receptors for insulin, epidermal growth factor, platelet-derived growth factor, and fibroblast growth factor." J Biol Chem **271**(10): 5603-9.
- Weng, L. P., W. M. Smith, P. L. Dahia, U. Ziebold, E. Gil, J. A. Lees and C. Eng (1999). "PTEN suppresses breast cancer cell growth by phosphatase activity-dependent G1 arrest followed by cell death." Cancer Res **59**(22): 5808-14.
- Widmann, C., S. Gibson and G. L. Johnson (1998). "Caspase-dependent cleavage of signaling proteins during apoptosis. A turn-off mechanism for anti-apoptotic signals." J Biol Chem **273**(12): 7141-7.
- Wijkander, J., L. S. Holst, T. Rahn, S. Resjo, I. Castan, V. Manganiello, P. Belfrage and E. Degerman (1997). "Regulation of protein kinase B in rat adipocytes by insulin,

- vanadate, and peroxovanadate. Membrane translocation in response to peroxovanadate." J Biol Chem **272**(34): 21520-6.
- Willard, F. S. and M. F. Crouch (2001). "MEK, ERK, and p90RSK are present on mitotic tubulin in Swiss 3T3 cells: a role for the MAP kinase pathway in regulating mitotic exit." Cell Signal **13**(9): 653-64.
- Woodman, P. G. (2003). "p97, a protein coping with multiple identities." J Cell Sci **116**(Pt 21): 4283-90.
- Wymann, M. P., M. Zvelebil and M. Laffargue (2003). "Phosphoinositide 3-kinase signalling-which way to target?" Trends Pharmacol Sci **24**(7): 366-76.
- Xiong, W. and J. T. Parsons (1997). "Induction of apoptosis after expression of PYK2, a tyrosine kinase structurally related to focal adhesion kinase." J Cell Biol **139**(2): 529-39.
- Xu, H., K. W. Lee and M. Goldfarb (1998). "Novel recognition motif on fibroblast growth factor receptor mediates direct association and activation of SNT adapter proteins." J Biol Chem **273**(29): 17987-90.
- Yaffe, M. B., G. G. LeParc, J. Lai, T. Obata, S. Volinia and L. C. Cantley (2001). "A motif-based profile scanning approach for genome-wide prediction of signaling pathways." Nat Biotechnol **19**(4): 348-53.
- Yamashita, J., M. Ogawa, S. Yamashita, K. Nomura, M. Kuramoto, T. Saishoji and S. Shin (1994). "Immunoreactive hepatocyte growth factor is a strong and independent predictor of recurrence and survival in human breast cancer." Cancer Res **54**(7): 1630-3.
- Yang, F., E. Tang, K. Guan and C. Y. Wang (2003). "IKK beta plays an essential role in the phosphorylation of RelA/p65 on serine 536 induced by lipopolysaccharide." J Immunol **170**(11): 5630-5.
- Yang, X. H., S. Edgerton and A. D. Thor (2005). "Reconstitution of caspase-3 sensitizes MCF-7 breast cancer cells to radiation therapy." Int J Oncol **26**(6): 1675-80.
- Yang, Z. Z., O. Tschopp, M. Hemmings-Mieszczak, J. Feng, D. Brodbeck, E. Perentes and B. A. Hemmings (2003). "Protein kinase B alpha/Akt1 regulates placental development and fetal growth." J Biol Chem **278**(34): 32124-31.
- Yano, S., H. Tokumitsu and T. R. Soderling (1998). "Calcium promotes cell survival through CaM-K kinase activation of the protein-kinase-B pathway." Nature **396**(6711): 584-7.
- Yao, X., A. Freas, J. Ramirez, P. A. Demirev and C. Fenselau (2001). "Proteolytic 18O labeling for comparative proteomics: model studies with two serotypes of adenovirus." Anal Chem **73**(13): 2836-42.
- Yee, D., S. Paik, G. S. Lebovic, R. R. Marcus, R. E. Favoni, K. J. Cullen, M. E. Lippman and N. Rosen (1989). "Analysis of insulin-like growth factor I gene expression in malignancy: evidence for a paracrine role in human breast cancer." Mol Endocrinol **3**(3): 509-17.
- Yenush, L., C. Zanella, T. Uchida, D. Bernal and M. F. White (1998). "The pleckstrin homology and phosphotyrosine binding domains of insulin receptor substrate 1 mediate inhibition of apoptosis by insulin." Mol Cell Biol **18**(11): 6784-94.

- Yiangou, C., J. J. Gomm, R. C. Coope, M. Law, Y. A. Luqmani, S. Shousha, R. C. Coombes and C. L. Johnston (1997). "Fibroblast growth factor 2 in breast cancer: occurrence and prognostic significance." Br J Cancer **75**(1): 28-33.
- Yin, H. L. and J. T. Stull (1999). "Proteins that regulate dynamic actin remodeling in response to membrane signaling minireview series." J Biol Chem **274**(46): 32529-30.
- Yoshida, K. and Y. Miki (2004). "Role of BRCA1 and BRCA2 as regulators of DNA repair, transcription, and cell cycle in response to DNA damage." Cancer Sci **95**(11): 866-71.
- Zhang, H., J. P. Stallock, J. C. Ng, C. Reinhard and T. P. Neufeld (2000). "Regulation of cellular growth by the Drosophila target of rapamycin dTOR." Genes Dev **14**(21): 2712-24.
- Zhang, L., S. Kharbanda, S. W. McLeskey and F. G. Kern (1999). "Overexpression of fibroblast growth factor 1 in MCF-7 breast cancer cells facilitates tumor cell dissemination but does not support the development of macrometastases in the lungs or lymph nodes." Cancer Res **59**(19): 5023-9.
- Zhang, W., A. N. Krutchinsky and B. T. Chait (2003). "'De novo' peptide sequencing by MALDI-quadrupole-ion trap mass spectrometry: a preliminary study." J Am Soc Mass Spectrom **14**(9): 1012-21.
- Zhang, X. and T. A. Vik (1997). "Growth factor stimulation of hematopoietic cells leads to membrane translocation of AKT1 protein kinase." Leuk Res **21**(9): 849-56.
- Zhang, Z., C. Coomans and G. David (2001). "Membrane heparan sulfate proteoglycan-supported FGF2-FGFR1 signaling: evidence in support of the "cooperative end structures" model." J Biol Chem **276**(45): 41921-9.
- Zhou, B. P. and M. C. Hung (2002). "Novel targets of Akt, p21(Cip1/WAF1), and MDM2." Semin Oncol **29**(3 Suppl 11): 62-70.
- Zhou, B. P., Y. Liao, W. Xia, B. Spohn, M. H. Lee and M. C. Hung (2001). "Cytoplasmic localization of p21Cip1/WAF1 by Akt-induced phosphorylation in HER-2/neu-overexpressing cells." Nat Cell Biol **3**(3): 245-52.
- Zhou, H., X. M. Li, J. Meinkoth and R. N. Pittman (2000). "Akt regulates cell survival and apoptosis at a postmitochondrial level." J Cell Biol **151**(3): 483-94.
- Zhou, H., J. D. Watts and R. Aebersold (2001). "A systematic approach to the analysis of protein phosphorylation." Nat Biotechnol **19**(4): 375-8.
- Zhu, H. and M. Snyder (2003). "Protein chip technology." Curr Opin Chem Biol **7**(1): 55-63.
- Zhu, X., H. Komiya, A. Chirino, S. Faham, G. M. Fox, T. Arakawa, B. T. Hsu and D. C. Rees (1991). "Three-dimensional structures of acidic and basic fibroblast growth factors." Science **251**(4989): 90-3.

ANNEXES

***ANNEXE 1 : PROTEOMICS IN ONCOLOGY: THE
BREAST CANCER EXPERIENCE***

ANNEXE 2 : DIFFERENTIAL EXPRESSION OF PROTEINS IN RESPONSE TO CERAMIDE-MEDIATED STRESS SIGNAL IN COLON CANCER CELLS BY 2-D GEL ELECTROPHORESIS AND MALDI-TOF-MS

Marianne Fillet a passé plusieurs mois dans le laboratoire à développer l'approche protéomique par électrophorèse bidimensionnelle pour étudier les modifications de protéome liées au stress apoptogène des céramides sur les cellules de colon. Ma participation à ce travail a été l'accompagnement de Marianne dans les premières étapes de solubilisation des protéines de cellules de colon et la séparation en électrophorèse bidimensionnelle. Ce travail a abouti aux résultats décrits dans l'article suivant publié dans Journal of Proteome Research.

ANNEXE 3 : MASSES MONOISOTOPIQUES ET MOYENNES DES 20 ACIDES AMINES

	monoisotopic	average
Alanine (A)	71.03711	71.0788
Arginine (R)	156.10111	156.1875
Asparagine (N)	114.04293	114.1038
Aspartic acid (D)	115.02694	115.0886
Cysteine (C)	103.00919	103.1388
Glutamic acid (E)	129.04259	129.1155
Glutamine (Q)	128.05858	128.1307
Glycine (G)	57.02146	57.0519
Histidine (H)	137.05891	137.1411
Isoleucine (I)	113.08406	113.1594
Leucine (L)	113.08406	113.1594
Lysine (K)	128.09496	128.1741
Methionine (M)	131.04049	131.1926
Phenylalanine (F)	147.06841	147.1766
Proline (P)	97.05276	97.1167
Serine (S)	87.03203	87.0782
Threonine (T)	101.04768	101.1051
Tryptophan (W)	186.07931	186.2132
Tyrosine (Y)	163.06333	163.1760
Valine (V)	99.06841	99.1326

ANNEXE 4 : TABLE DES FIGURES

Figure 1. Structure de la glande mammaire.	21
Figure 2. Schéma de l'arbre galactophorique.....	22
Figure 3. Histologie de la glande mammaire normale.	23
Figure 4. Les différentes phases de la croissance et du fonctionnement de la glande mammaire.....	24
Figure 5. Schéma hypothétique des anomalies génétiques au cours de la cancérogenèse mammaire.	29
Figure 6. Régulation de la croissance de la cellule mammaire.	32
Figure 7. Représentation de l'interaction ternaire du FGF-2 avec le FGFR et les chaînes d'héparanes sulfates. .	39
Figure 8. Principales voies de signalisation en aval du récepteur FGFR.	43
Figure 9. Organisation structurale des protéines adaptatrices du FGFR.	44
Figure 10. Situation génomique des trois genes Akt.....	47
Figure 11. Transcrits des 3 gènes de Akt.	48
Figure 12. Structure schématique des isoformes de Akt chez l'humain.....	48
Figure 13. Cristallographie du PH domain de Akt1 interagissant avec un PIP3.....	49
Figure 14. Distribution des ARNm des trois isoformes de Akt dans les différents tissus murins.....	50
Figure 15. Schéma du mode d'activation de Akt.....	53
Figure 16. Alignements multiples de séquences peptidiques et de domaines de structure des isoformes de Akt. 55	
Figure 17. Conservation phlogénétique de la voie PI3K/Akt.....	56
Figure 18. Schéma explicatif d'un marquage isotopique.....	74
Figure 19. Principe du système double-hybride.....	78
Figure 20. Principe de la méthode phage display.....	81
Figure 21. Méthode de double purification d'affinité.....	82
Figure 22. Représentation schématique du mode d'ionisation par électronébulisation.....	84
Figure 23. Schéma explicatif de l'ionisation de type MALDI.....	86
Figure 24. Représentation schématique du quadripôle.....	88
Figure 25. Schéma explicatif de l'analyse temps de vol en mode linéaire.....	89
Figure 26. Principe du post source decay.....	90
Figure 27. Nomenclature internationale des ions issus de la fragmentation de peptides.....	94
Figure 28. Formules semi-développées des ions issus de la fragmentation de peptides.....	94
Figure 29. Fragmentation la plus fréquente des peptides.....	95
Figure 30. Obtention des informations de séquence à partir d'un spectre MS-MS.....	95
Figure 31. Gel 2D de séparation de Akt et de ses partenaires.....	170
Figure 32. Schéma hypothétique d'action d'Akt sur la voie NFkB.....	179
Figure 33. Schéma récapitulatifs des résultats obtenus.....	183
Figure 34. Signalisation actuellement connue de la kinase Akt.....	184