

BIO 451

Correction du contrôle des connaissances

25 Janvier 2012

Les phosphatidyl inositol phosphate dans les cascades de signalisation et le cancer.

A-Phosphorylation des phosphatidyl inositol phosphate et ses conséquences.

1) Le phosphatidyl inositol est un phospholipide (ou glycérophospholipide ou phosphoglycéride), constituant des membranes cellulaires. Il est composé d'un groupement phosphatidyl (deux acides gras estérifiés sur une molécules de glycérol, elle-même liée de façon covalente à un acide phosphorique) dont le groupement phosphate est associé à une molécule d'inositol, un polyol cyclique.

2) Les enzymes catalysant des déphosphorylations sont des « phosphatases ». Les phosphatases qui comme PTEN déphosphorylent des lipides sont des « lipide phosphatases ».

3) Les lipides sont dans les membranes biologiques. Le groupement inositol étant polaire, il se situe à la surface des membranes. Les réactions catalysées par PI3K et PTEN se déroulent donc à la surface de la membrane.

4)

a- Le WB anti-actine est un contrôle de charge.

b- Le WB anti PTEN permet de vérifier que PTEN n'est plus exprimé dans les cellules transfectées avec le siRNA-PTEN et que la protéine est présente dans des quantités identiques dans les autres conditions.

c- Le WB anti-AKT permet de vérifier que les variations observées sur P-AKT ne sont pas dues à des variations du niveau d'expression de la protéine.

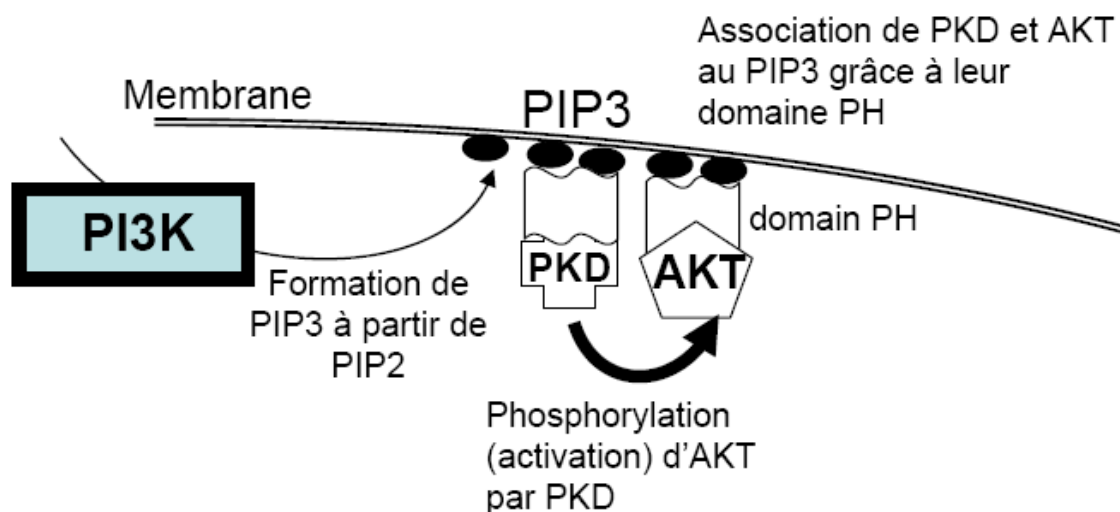
5) La phosphorylation d'AKT diminue lorsque les cellules sont traitées avec un inhibiteur de la PI3K et augmente lorsque les cellules n'expriment plus PTEN. On en déduit que les PIP3 entraînent l'activation d'AKT.

6) PIP3 étant un lipide, il n'a pas d'activité catalytique et ne peut pas directement entraîner la phosphorylation d'AKT. On peut imaginer que (i) AKT peut se lier à PIP3 et que cette liaison peut induire un changement de conformation permettant l'activation de la protéine et sa phosphorylation (par autophosphorylation ou grâce à une kinase activée par AKT). (ii) PIP3 permet le recrutement d'AKT à la membrane à proximité d'une kinase qui pourra alors la phosphoryler.

7) La radioactivité correspond à la liaison de phosphate radioactif sur le substrat X. Elle rend donc compte de la phosphorylation de ce substrat par AKT et donc de l'activité de la kinase.

8) La présence d'AKT seule ne permet que très peu de phosphorylation de X. Par contre lorsque PDK est présente, AKT est phosphorylée et active (elle phosphoryle X). La forme catalytiquement inactive de PDK n'a pas cet effet. Donc PDK phosphoryle et active AKT.

9) Cette expérience in vitro montre que la présence du phosphatidyl inositol phosphate n'est pas directement nécessaire à l'activation d'AKT par PKD. Le rôle de PIP3 dans la cellule est donc de rapprocher les deux protéines pour favoriser la phosphorylation d'AKT par PKD.



10) PI3K stimule la croissance de la population cellulaire. PTEN, au contraire, inhibe la croissance cellulaire.

11) Les effets observés sur la croissance de la population cellulaire peuvent résulter d'un contrôle de la division (cycle cellulaire) ou d'un contrôle de la mort cellulaire (apoptose).

12) On pourrait utiliser les cellules de l'expérience précédente, en les analysant par FACS après marquage à l'iodure de propidium. On détecterait ainsi les cellules en phase G2 et les cellules apoptotiques.

B- Rôle d'AKT dans la réponse cellulaire à l'insuline.

1) A partir de la liste des substrats connus d'AKT, on peut déterminer une séquence consensus reconnue par la kinase. On recherche dans la séquence de la protéine d'intérêt des sérines et thréonines et on regarde si certains de ces résidus sont entourés de la séquence consensus reconnue par la kinase.

2) Les membranes cellulaires ne laissent pas passer l'ATP alors que les ions phosphate peuvent traverser la membrane cellulaire grâce à des transporteurs spécifiques.

3) L'immunoprécipitation permet de séparer la protéine FoxO de toutes les autres protéines qui ont pu être phosphorylées pendant l'incubation en présence de phosphate radioactif.

4)

a- Comme on a réalisé une immunoprécipitation de FoxO, la bande observée en autoradiographie est très probablement FoxO, qui a été phosphorylée.

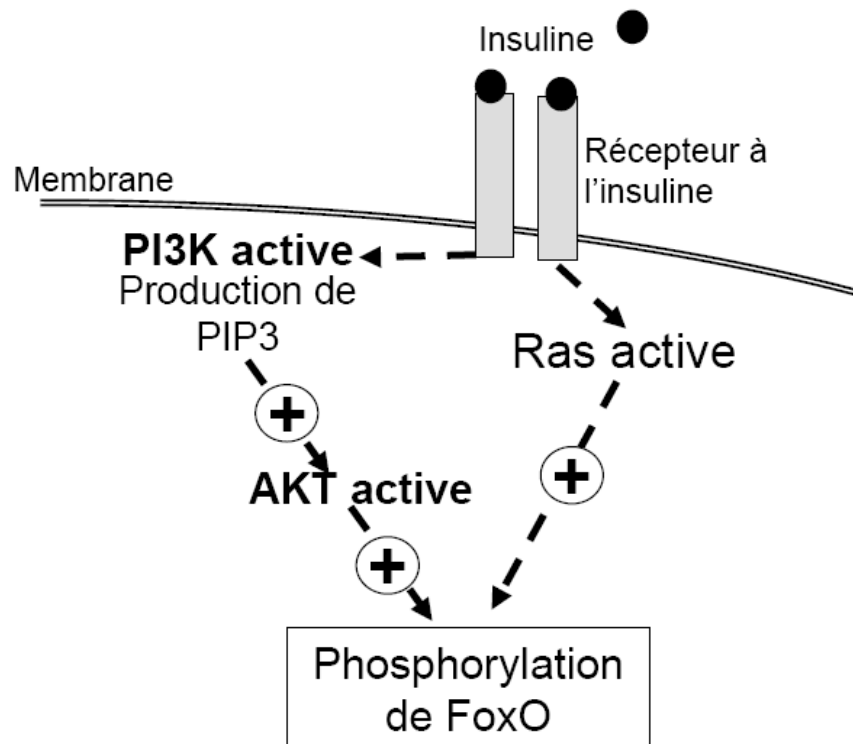
b- La bande radioactive devrait correspondre à une protéine de même poids moléculaire que celle observée dans le WB FoxO.

c- Comme la quantité de FoxO est la même dans toutes les colonnes. Les différences d'intensité correspondent à des différences de phosphorylation de la protéine FoxO.

5) La protéine FoxO est phosphorylée en réponse à la stimulation des cellules par l'insuline. Cette phosphorylation dépend de l'activité de la PI3K, d'AKT d'une part et de Ras d'autre part.

6) Dans cette expérience, la phosphorylation de FoxO s'est produite dans la cellule, en présence de nombreuses kinases. Rien n'indique donc qu'AKT phosphoryle directement FoxO. Il serait possible de réaliser la même expérience en transfectant les cellules avec FoxO et une forme de FoxO mutée sur le site consensus de phosphorylation sur AKT. Il est aussi possible d'envisager de purifier les protéines AKT et FoxO et de réaliser un test de phosphorylation in vitro (comme dans la figure A.2).

7)



8) La surexpression de FoxO induit une augmentation de l'expression de p27^{kip} et la liaison de p27 à la cycline E.

9) La cycline E peut former un complexe avec Cdk2. En immunoprécipitant la cycline E, on co-précipite la protéine Cdk2 qui lui est associée.

10) La radioactivité détectée correspond très probablement à la phosphorylation de l'histone H1. Cdk2, qui est une kinase, est présente dans l'immunoprécipité. Les variations d'intensité

correspondent donc à des variations de la phosphorylation de l'histone H1 qui traduisent des variations de l'activité de Cdk2.

11) a- p27^{kip} contribue partiellement à l'inhibition de Cdk2 par FoxO.

b- p27^{kip} est présent dans l'immunoprécipité de la cycline E. Il n'affecte pas la liaison de Cdk2 à cycline E ni la liaison de l'histone H1 au complexe Cdk2-cycline E. Il est possible qu'il inhibe Cdk2 en empêchant sa liaison à l'ATP.

12) a- FoxO provoque une diminution de la cycline D, ce qui induit probablement une diminution de l'activité de Cdk4. Cette diminution de l'activité de Cdk4 est aussi vérifiée par une diminution de la phosphorylation de Rb, qui est normalement phosphorylée par Cdk4.

b- Cette régulation se produit indépendamment de p27^{kip}.

13) FoxO a deux effets sur Rb. D'une part, il augmente son niveau d'expression, ce qui doit augmenter la liaison de Rb à E2F. D'autre part, il entraîne une diminution de la phosphorylation de Rb, ce qui facilite aussi la formation du complexe Rb-E2F. Les deux effets ont pour conséquence une diminution de la transcription induite par E2F.

14) En augmentant l'expression de Rb et en diminuant sa phosphorylation, FoxO augmente fortement la liaison de Rb à E2F. La formation du complexe Rb-E2F empêche la liaison de E2F à l'ADN et inhibe donc la transcription des gènes contrôlés par E2F.

15) FoxO induit l'expression d'une CKi (p27^{kip}) et inhibe l'activité du complexe cycline E-Cdk2. Il induit probablement l'arrêt du cycle cellulaire. FoxO provoque aussi l'inhibition de Cdk4 et de la transcription des gènes contrôlés par E2F. Les complexes cycline E-Cdk2 et cycline D-Cdk4 étant essentiels au déroulement du cycle cellulaire, en particulier en fin de phase G1 et en début de phase S, FoxO a probablement un effet inhibiteur sur l'initiation de la phase S et donc sur la prolifération des cellules.

16) Les cellules dans la zone 1 ont une quantité d'ADN minimale ; elles sont en phase G0 ou G1 (ou en fin de phase M).

Les cellules dans la zone 3 ont approximativement deux fois plus d'ADN que celles dans la zone 1. Ce sont des cellules en phase G2 (ou en fin de phase S, ou en début de phase M).

Les cellules dans la zone 2 ont une quantité d'ADN intermédiaire entre celles de la zone 1 et celles de la zone 3, elles sont en phase S.

17) Cette expérience montre qu'une forte activité de la PI3K et une forte concentration en PIP3 dans la cellule induit une augmentation du nombre de cellules en phase S et G2. Ceci montre que la PI3K induit une entrée dans le cycle cellulaire des cellules en G0 et/ou une augmentation de la vitesse du cycle cellulaire.

18) Les lamines sont des protéines exclusivement nucléaires et la tubuline une protéine exclusivement cytoplasmique. Ces western blots permettent de vérifier que le fractionnement cellulaire a été correctement réalisé.

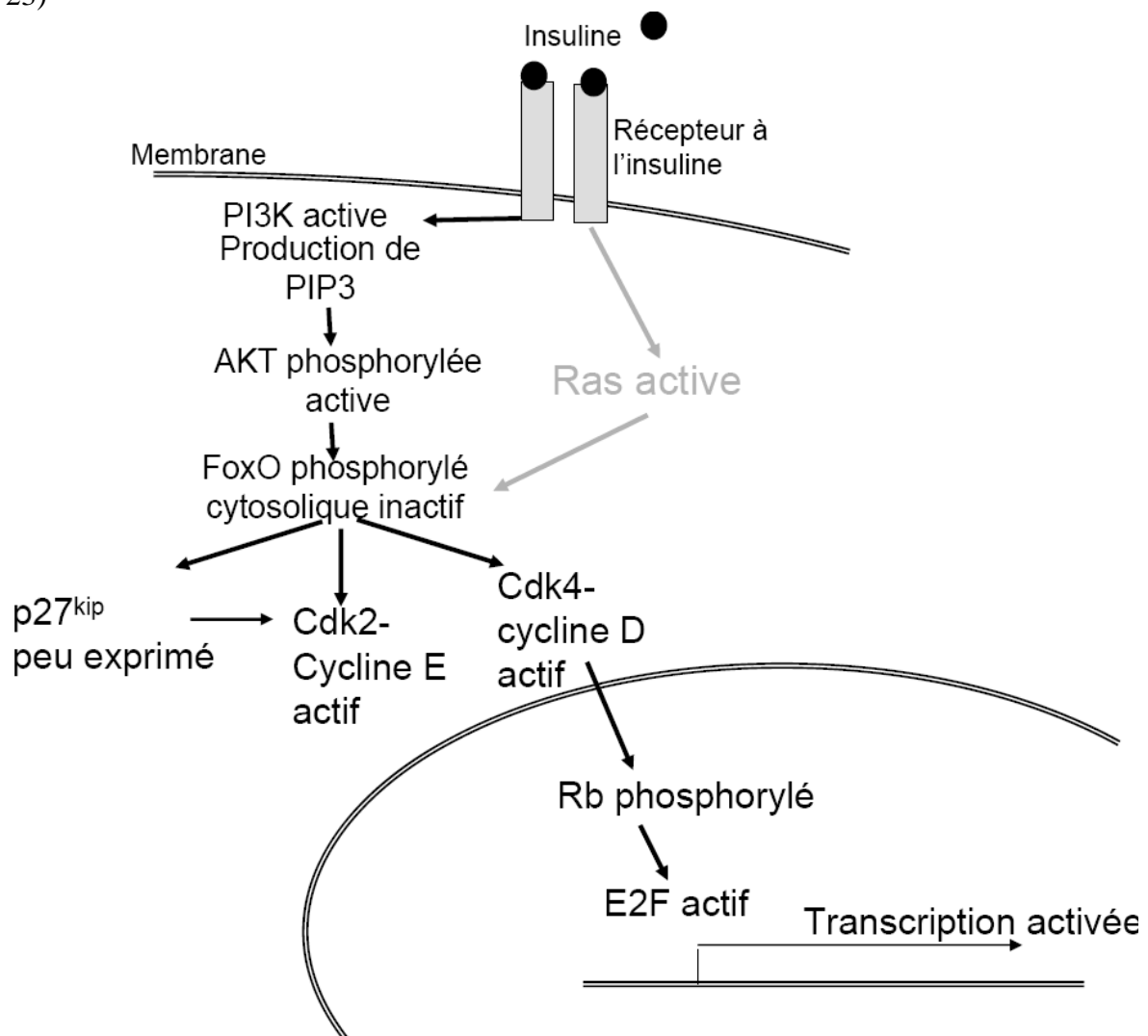
19) Les cellules doivent être lysées par choc hypoosmotique pour éviter la rupture de l'enveloppe nucléaire. Les noyaux peuvent être séparés du reste de la cellule par centrifugation, car ils sont plus « lourds » que le cytoplasme.

20) Cette expérience montre qu'une forte activité de la PI3K et une forte concentration en PIP3 dans la cellule induisent la localisation de FoxO, qui est normalement nucléaire, dans le cytoplasme.

21) Comme les effets de PIP3 et de FoxO sur le cycle cellulaire sont opposés, il est probable que PIP3 entraîne une inhibition de l'activité de FoxO.

22) AKT, activée par le PIP3 généré par la PI3K, peut phosphoryler FoxO. Par ailleurs, on sait d'après la figure B.5 que la PI3K induit la relocalisation de FoxO dans le cytoplasme, ce qui très probablement inhibe son activité en l'empêchant de réguler la transcription. On peut donc proposer que la phosphorylation de FoxO par AKT provoque sa relocalisation dans le cytoplasme, peut-être en influençant sa liaison aux exportines/importines qui contrôlent le passage des pores nucléaires.

23)



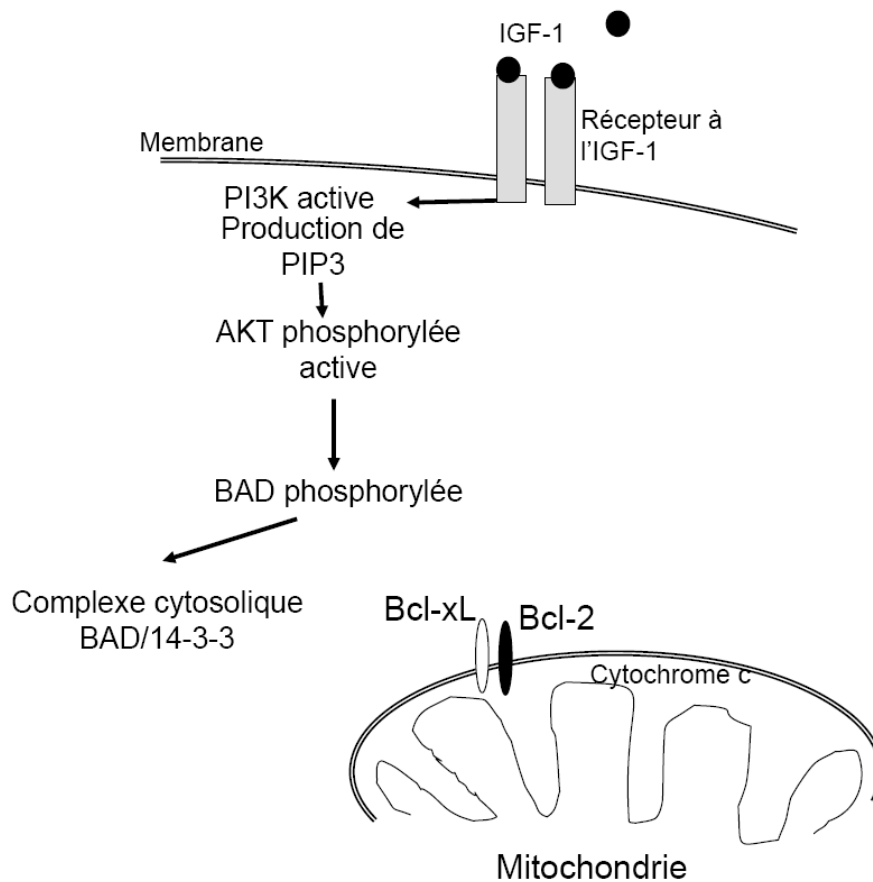
24) L'insuline induit l'activation d'AKT et conduit ainsi à l'inhibition de FoxO, qui agit normalement en inhibiteur du cycle cellulaire. Donc l'insuline facilite probablement la reprise et/ou le déroulement du cycle cellulaire.

C- Rôle d'AKT dans la réponse cellulaire à l'IGF-1 (Insulin-like Growth Factor-1).

- 1) La fragmentation nucléaire est un évènement accompagnant l'apoptose. Pour quantifier les cellules apoptotiques il est aussi possible de faire un immunomarquage des phosphatidyl sérine sur les cellules non perméabilisées (les phosphatidyl sérine n'étant présentes sur l'hémimembrane externe que dans les cellules apoptotiques), ou un immunomarquage du cytochrome c (qui est cytosolique dans les cellules apoptotiques).
- 2) AKT est nécessaire à la survie cellulaire induite par l'IGF-1. De plus une forme active d'AKT protège de l'apoptose des cellules en conditions de sevrage. Donc, AKT favorise la survie cellulaire.
- 3) La surexpression de WT-BAD a un effet négatif sur la survie des cellules traitées par IGF-1. Ceci correspond à son activité pro-apoptotique.
- 4) BAD, et plus précisément la sérine 136 de BAD, est nécessaire à la survie cellulaire induite par la forme active d'AKT.
- 5) Les cellules sont incubées en présence de méthionine ^{35}S qui est un acide aminé. La radioactivité est donc incorporée aux protéines synthétisées par la cellule pendant l'incubation en présence de méthionine ^{35}S .
- 6) Comme il s'agit d'une immunoprécipitation anti-BAD, la bande obtenue correspond probablement à BAD. Cette bande apparaît en radioactivité ^{35}S et ^{32}P , il s'agit de BAD synthétisée pendant l'expérience et phosphorylée pendant l'expérience.
- 7) La forme phosphorylée est visible dans la fraction cytosolique.
- 8) a- La forme non phosphorylée de BAD est visible dans la fraction membranaire et co-précipite avec Bcl-xL qui est une protéine transmembranaire de la membrane mitochondriale externe. La forme de BAD non phosphorylée est donc associée à la membrane mitochondriale externe.
b- La localisation de BAD à la membrane mitochondriale a pour effet de favoriser la formation de canaux et de libérer le cytochrome c dans le cytosol. Ceci conduit à l'activation de la voie apoptotique mitochondriale. Elle implique la formation de l'apoptosome et l'activation de la caspase 9.
- 9) Les sérines 112 et 136 sont toutes les deux nécessaires à la liaison de BAD à 14-3-3. Lorsque seulement une des deux est présente, la liaison de BAD à 14-3-3 est faible, lorsque les deux sont absentes, il n'y a plus du tout de liaison.
- 10) Il s'agit de la protéine BAD (car visible dans le western blot anti-BAD) endogène.
- 11) a- BAD et AKT co-immunoprécipitent ce qui suggère qu'elles interagissent dans la cellule.
b- Cette interaction n'est pas affectée par l'activité d'AKT.
c- Cette interaction ne nécessite ni la sérine 112 ni la sérine 136 de BAD
- 12) a- L'activité d'AKT est nécessaire à la phosphorylation de BAD.

b- Les deux hypothèses les plus simples sont qu'AKT phosphoryle directement BAD, ou qu'AKT active directement ou indirectement une autre kinase qui est responsable de la phosphorylation de BAD.

13)



D- Régulation des phosphatidyl inositol phosphate au cours de l'oncogénèse.

1) Une forme constitutivement active d'AKT induirait une augmentation de la prolifération cellulaire et une diminution de l'apoptose (ou augmentation de la survie en absence de facteur de croissance).

2) AKT est un proto-oncogène car si AKT devient constitutivement active dans la cellule, il va induire une augmentation de la prolifération cellulaire et une diminution de l'apoptose et rendre ainsi les cellules indépendantes des facteurs de croissance et de survie. Son activation constitutive le transformera en oncogène car elle pourra favoriser la formation d'une tumeur.

3) PTEN agit comme un inhibiteur de la voie AKT. Comme cette voie est oncogénique, PTEN agit en suppresseur de tumeur. Les mutations observées dans la cancer sont donc probablement des mutations conduisant à la perte d'activité d'enzymatique.

4) Pour éviter la progression de ce type de cancer, il faudrait pouvoir bloquer la voie AKT. Il serait éventuellement possible d'utiliser une construction dominant négative d'AKT ou de manière plus facile un inhibiteur de la PI3K comme la wortmanine.