

Université de Montréal

Caractérisation de l'oxydoréduction de la protéine tyrosine phosphatase 1B dans la signalisation du récepteur à l'EGF

par

Alexandre Bergeron

Département de Sciences Biomédicales

Faculté de Médecine

Mémoire présenté

en vue de l'obtention du grade de maîtrise

en Sciences Biomédicales

option Sciences Cardiovasculaires

Le 27 avril 2017

© Alexandre Bergeron, 2017

Ce mémoire intitulé :

**Caractérisation de l'oxydoréduction de la protéine tyrosine
phosphatase 1B dans la signalisation du récepteur à l'EGF**

Présenté par :

Alexandre Bergeron

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Jean-Philippe Gratton

Président-rapporteur

Mathieu Ferron

Membre du jury

Benoit Boivin

Directeur de recherche

Bruce Allen

Co-directeur de recherche

Résumé

Les ROS (*reactive oxygen species*) inactivent les protéines tyrosines phosphatases (PTPs) en oxydant leur cystéine catalytique, ce qui cause d'importants changements conformationnels. Afin de caractériser la régulation rédox de la protéine tyrosine phosphatase 1B (PTP1B), nous avons modélisé la structure tridimensionnelle de ses formes oxydées et réduites et nous avons identifié un peptide dérivé de sa boucle de liaison aux phosphotyrosines (BLP) nouvellement exposé au cytosol dans sa forme oxydée. Dans le but d'identifier de nouveaux partenaires d'interaction de PTP1B oxydé, nous avons utilisé ce peptide BLP, effectué des *pull-downs*, puis avons purifié et identifié la protéine 14-3-3 ζ . Nous avons stimulé des cellules avec le facteur de croissance épidermique (EGF) afin de caractériser par co-immunoprécipitation l'interaction entre PTP1B oxydé et 14-3-3 ζ . Nos résultats indiquent que cette interaction était dépendante des ROS intracellulaires et de la phosphorylation de PTP1B par la protéine kinase B (PKB). La liaison de 14-3-3 ζ était par ailleurs déstabilisée par le R18, un inhibiteur des 14-3-3, et la triciribine, un inhibiteur de PKB. De plus, plusieurs peptides BLP pénétrants bloquaient l'interaction entre PTP1B oxydé et 14-3-3 ζ et favorisaient la réduction et la réactivation de PTP1B. Nos résultats suggèrent que l'interaction entre la protéine 14-3-3 ζ et PTP1B est nécessaire afin de stabiliser la forme oxydée de la phosphatase. Étant donné le rôle important des PTPs dans plusieurs pathologies humaines, le développement de peptides activateurs de PTPs constitue une avancée importante.

Mots-clés : PTP1B, phosphatase, 14-3-3, protéine, ROS, oxydation, réduction, signalisation intracellulaire, EGFR, immunoprécipitation, peptide, cystéine, tyrosine.

Abstract

Reactive oxygen species (ROS) inactivate protein tyrosine phosphatases (PTPs) by oxidizing their catalytic cysteine, initiating important conformational changes. To characterize the redox regulation of protein tyrosine phosphatase 1B (PTP1B), we modeled the tridimensional structure of its oxidized and reduced forms and we detected a newly exposed peptide derived from its phosphotyrosine binding loop (BLP) in its oxidized form. To find new proteins interacting with the oxidized form of PTP1B, we used this BLP peptide in pull-down assays and identified the 14-3-3 ζ protein as a BLP-interacting protein. We stimulated cells with the epidermal growth factor (EGF) to characterize the interaction between oxidized PTP1B and 14-3-3 ζ with co-immunoprecipitations. As expected, our results indicate that this interaction depends on intracellular ROS production. In addition, 14-3-3 ζ interaction was prevented by preincubating cells with R18, a 14-3-3 inhibitor, or by triciribine, a PKB inhibitor, prior to EGF stimulation. Furthermore, several cell-penetrating BLP peptides prevented the interaction between oxidized PTP1B and 14-3-3 ζ and promoted its reduction and reactivation. Our results suggest that the interaction between 14-3-3 ζ and PTP1B is essential to stabilize the oxidized form of the phosphatase. Given the important role of PTPs in many human diseases, the development of PTP activating peptides represents a significant progress.

Keywords: PTP1B, phosphatase, 14-3-3, protein, ROS, oxidation, reduction, intracellular signaling, EGFR, immunoprecipitation, peptide, cysteine, tyrosine.

Table des matières

Résumé.....	iii
Abstract.....	iv
Table des matières.....	v
Liste des tableaux.....	viii
Liste des figures	ix
Liste des abréviations.....	x
Remerciements.....	xvi
Chapitre 1. Introduction	1
1.1 Les maladies cardiovasculaires.....	1
1.1.1 Les facteurs de risque.....	1
1.1.2 L’hypertrophie cardiaque et l’insuffisance cardiaque.....	3
1.2 La signalisation intracellulaire	5
1.2.1 Les protéines kinases	5
1.2.2 Les RTKs et les MAPKs.....	7
1.2.3 La voie PI3K-PKB.....	10
1.2.4 Les récepteurs couplés aux protéines G.....	11
1.2.5 Transactivation de l’EGFR par les récepteurs couplés aux protéines G.....	12
1.2.6 Le stress mécanique	13
1.2.7 Les protéines 14-3-3	14
1.3 Les phosphatases.....	15
1.3.1 Les sérine/thréonine phosphatases	16
1.3.2 Les phosphatases HAD	17
1.3.3 Les PTPs	18
1.3.3.1 Les PTPs classiques	19
1.3.3.1.1 La protéine tyrosine phosphatase 1B	21
1.3.3.1.1.1 Structure de PTP1B.....	21

1.3.3.1.1.2 Mécanisme d'action de PTP1B.....	22
1.3.3.1.1.3 Les substrats de PTP1B	24
1.3.3.1.1.4 Le rôle de PTP1B dans les pathologies humaines	25
1.3.3.2 Les DUSPs	26
1.4 Les dérivés réactifs de l'oxygène.....	27
1.4.1 Les ROS comme régulateurs de la transduction intracellulaire.....	27
1.4.1.1 La régulation des PTPs par l'oxydation réversible	28
1.4.2 La régulation des phosphatases HAD par l'oxydation réversible.....	31
1.5 Objectifs.....	32
Chapitre 2. Matériel et Méthodes.....	33
2.1 Préparation des ADNs plasmidiques	33
2.1.1 Transformation bactérienne	33
2.1.2 Isolation de l'ADN plasmidique	34
2.2 Culture cellulaire et transfection.....	34
2.3 Préparation des lysats cellulaires	35
2.3.1 Préparation de la boîte hypoxique.....	35
2.3.2 Traitements préalables	35
2.3.3 Lyse cellulaire et immunoprécipitations.....	36
2.4 Cysteinyl-labeling assay	36
2.4.1 Lyse cellulaire.....	36
2.4.2 Biotinylation des PTPs oxydées.....	37
2.4.3 Immunoprécipitation des PTPs oxydées	37
2.5 Immunoblots	38
2.6 Couplage de billes d'iodoacétyle et repêchage de 14-3-3 ζ	40
Chapitre 3. Résultats.....	41
3.1 L'oxydation de PTP1B promeut de nouvelles interactions protéines-protéines.....	41
3.2 Caractérisation de l'oxydation réversible de PTP1B	44
3.3 Caractérisation de l'interaction entre 14-3-3 ζ et PTP1B oxydé.....	46
3.3.1 La forme oxydée de PTP1B interagit avec 14-3-3 ζ	46
3.3.2 L'interaction entre PTP1B oxydé et 14-3-3 ζ est modifiée par les antioxydants	48

3.3.3 Le R18 bloque l'interaction entre PTP1B et 14-3-3ζ	50
3.3.4 Le rôle de la sérine 50 dans l'interaction entre PTP1B et 14-3-3ζ	52
3.3.5 Des peptides dérivés de la boucle phosphotyrosine de PTP1B bloquent son interaction avec 14-3-3ζ.....	55
Chapitre 4. Discussion	59
4.1 L'oxydation des PTPs régule la signalisation intracellulaire.....	59
4.2 L'oxydation des PTPs induits d'importants changements conformationnels.....	60
4.3 14-3-3ζ est recrutée suite à l'oxydation de PTP1B	61
4.4 Les protéines 14-3-3 possèdent plusieurs modes d'action.....	62
4.5 L'interaction entre PTP1B et 14-3-3ζ est dépendante de sa phosphorylation par PKB. 63	
4.6 Des peptides dérivés de la boucle phosphotyrosine de PTP1B favorisent sa réactivation	65
4.7 Limites et approches alternatives.....	67
Chapitre 5. Conclusion.....	70
Bibliographie.....	72

Liste des tableaux

Tableau 2.1. Anticorps utilisés lors des immunoblots de type Western	39
--	----

Liste des figures

Figure 1.1. Différents types d'hypertrophie cardiaque.	4
Figure 1.2. La signalisation de l'EGFR	9
Figure 1.3. Les familles des protéines phosphatases	16
Figure 1.4. Structure du domaine catalytique de PTP1B.....	22
Figure 1.5. Mécanisme d'action de PTP1B	23
Figure 1.6. L'oxydation de PTP1B est réversible.....	30
Figure 3.1. L'oxydation de PTP1B induit d'importants changements conformationnels	44
Figure 3.2. L'activation du récepteur à l'EGF induit l'oxydation réversible de PTP1B dans les cellules humaines en culture	45
Figure 3.3. L'oxydation de PTP1B induit une nouvelle interaction avec 14-3-3ζ.....	47
Figure 3.4. L'interaction entre PTP1B et 14-3-3ζ dépend de la production de ROS cytosoliques	49
Figure 3.5. Le R18 bloque l'interaction entre PTP1B oxydé et 14-3-3ζ.....	51
Figure 3.6. La triciribine bloque l'interaction entre PTP1B et 14-3-3ζ.....	55
Figure 3.7. L'interaction entre PTP1B et 14-3-3ζ est bloquée par 4 peptides couplés au peptide TAT.....	57
Figure 3.8. La phosphorylation de l'EGFR	58

Liste des abréviations

ANG II : Angiotensine II

AT₁R : Récepteur à l'angiotensine II de type 1

ATP: Adénosine triphosphate

BAD: *Bcl-2 associated death promoter*

BLP : Peptide dérivé de la boucle de liaison aux phosphotyrosines

Ca²⁺: Calcium

CaMKII : Calmoduline kinase II

CDK: *Cyclin-dependent kinases*

CDK2: *Cyclin-dependent kinase 2*

CLA: *Cysteinyllabeling assay*

c-Src: *proto-oncogen tyrosine-protein kinase Src*

DAG: Diacylglycérol

DNA-PK: *DNA-dependent protein kinase*

DUSP: *Dual-specificity phosphatase*

DYRK: *Dual specificity tyrosine phosphorylation regulated kinase*

EGF : Facteur de croissance épidermique, *epidermal growth factor*

EGFR : Récepteur du facteur de croissance épidermique, *epidermal growth factor receptor*

EMEM: *Eagle's Minimum Essential Medium*

ERK: *Extracellular signal-regulated kinase*

ET-1 : Endothéline-1

ETAR : Récepteur à l'endothéline de type A

ETBR : Récepteur à l'endothéline de type B

FBS: *Fœtal bovine serum*

FGF: *Fibroblast growth factor*

FGFR: *Fibroblast growth factor receptor*

GDP: Guanosine diphosphate

GTP: Guanosine triphosphate

H₂O₂: Peroxyde d'hydrogène

HAD: Haloacide déhalogénases

IAA: Acide iodoacétique

IAP: Iodoacetyl-PEG2-Biotin

IGF-1: *Insulin-like growth factor 1*

IGF-2: *Insulin-like growth factor 2*

IGF-R: Récepteur à l'*insulin-like growth factor 1*

IP : Immunoprécipitation

IP₃ : Inositol 1,4,5-triphosphate

IR : Récepteur à l'insuline

IRS-1 : Substrat du récepteur à l'insuline 1

JAK2: Janus kinase 2

JNK: *c-Jun N-terminal kinases*

LMW-PTP: *Low molecular weight protein tyrosine phosphatase*

MAPK: *Mitogen-activated protein kinase*

MAPKK: *Mitogen-activated protein kinase kinase*

MAPKKK: *Mitogen-activated protein kinase kinase kinase*

MEK: *MAPK/ERK kinase ½*

MMP: Métalloprotéase

mTORC2: *Mammalian target of rapamycin complex 2*

NAC : N-acétylcystéine

NADPH : Forme réduite du *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*

NFAT: *Nuclear factor of activated T-cells*

NGF: *Nerve growth factor*

NOX: *Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase*

nrPTP : *Non-receptor protein tyrosine phosphatase*

nrTK : *Non-receptor tyrosine kinase*

O₂⁻ : Anion superoxyde

OH· : Radical hydroxyle

PDGF: *Platelet-derived growth factor*

PDGFR: *Platelet-derived growth factor receptor*

PDK1: *Phosphoinositide-dependent kinase-1*

PI3K: Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase

PIP₃: Phosphatidylinositol-3,4,5-bisphosphate

PKB/AKT: Protéine kinase B

PKC: Protéine Kinase C

PLC: Phospholipase C

PP: Sérine/thréonine phosphatase

PP1: Protéine phosphatase 1

PP2A: Protéine phosphatase 2

PPM: Phosphoprotéine M

PPP: Phosphoprotéine P

PTEN: *Phosphatase and tensin homolog*

PTP: Protéine tyrosine phosphatase

PTP1B: Protéine Tyrosine Phosphatase 1B

PTPH1: *Proteine tyrosine phosphatase non-receptor type 3*

PTPRB: *Receptor-type tyrosine-protein phosphatase beta*

PTPRF: *Receptor-type tyrosine-protein phosphatase F*

pTyr : Phosphotyrosine

RCPG : Récepteur couplé aux protéines G

ROS : Dérivés réactifs de l'oxygène, *reactive oxygen species*

RPTP : Récepteur protéine tyrosine phosphatase

RTK : Récepteur tyrosine kinase

SHP-2: *Src homology region 2-containing protein tyrosine phosphatase 2*

SO₂H: Acide sulfonique

SO₃H: Acide sulfonique

SOD: Superoxyde dismutase

SOH: Acide sulfénique

s-S: Streptavidine-sépharose

TAT: *Transactivator of transcription*

TCB: Triciribine

TCEP: Tris (2-carboxyethyl) phosphine

TCPTP: *T-cell enriched protein tyrosine phosphatase*

TGF- β : *Transforming growth factor beta*

TP1-4: *Transactivator of transcription peptides 1-4*

VEGF: *Vascular endothelial growth factor*

À ma mère, mes sœurs et ma copine

Remerciements

Je tiens d'abord à remercier mon superviseur Benoit Boivin qui a été pour moi un excellent mentor. J'ai eu beaucoup de plaisir à travailler et à discuter avec toi durant le développement de ce projet. Tu m'as grandement motivé et j'ai beaucoup apprécié les efforts que tu as faits ainsi que le temps que tu as pris pour me permettre de progresser dans mes apprentissages.

Je remercie également mon très grand ami Simon Lavoie qui m'a accompagné durant mon baccalauréat et ma maîtrise en entier et avec qui j'ai eu un plaisir incomparable. Je te souhaite la meilleure des chances pour la suite et sachant à quel point tu te dévoues dans ce que tu entreprends, je ne m'inquiète pas pour ton avenir. J'en profite pour te remercier de m'avoir aidé à stimuler les pétris sous la boîte hypoxique. Je remercie Pauly et Branka de m'avoir encouragé tout le long de mon parcours et surtout de nous avoir acheté une machine Nespresso. Les cafés d'après-midi étaient excellents.

Je remercie Gérald Coulis de m'avoir aidé pendant la majeure partie de ma formation en laboratoire. Tu m'as appris toutes les bases de biochimie dont j'avais besoin pour me permettre de cheminer par la suite.

J'aimerais remercier les Drs. Bruce Allen et Éric Thorin de m'avoir permis de compléter ma maîtrise dans les meilleures conditions possibles. Vous avez été extrêmement généreux et d'agréable compagnie durant la fin de mon parcours et j'apprécie les efforts que vous avez faits afin que je puisse étudier dans un environnement adéquat.

Merci à tous les membres des laboratoires de Dr. Bruce Allen et Dr. Éric Thorin: Pramod, Sherine, Fatiha, Joëlle, Ana, Nathalie, Olivia, Adeline, Laurie et Anthony de m'avoir gentiment accueilli avec eux durant la fin de ma maîtrise. Vous avez été d'agréable compagnie et j'ai beaucoup apprécié l'aide que vous m'avez offerte lorsque j'en ai eu besoin.

Merci à ma copine Élise Poirier de m'avoir soutenu durant tout mon parcours et qui continue de m'encourager dans ce que je fais. Après 8 ans à mes côtés, je te remercie de continuer à croire en moi. Merci à ma mère et mon père de m'avoir encouragé et avoir cru en moi pendant toutes ces années. Merci à mon frère Julian et à mes sœurs Sarah-Christina et Katherine d'avoir été à mes côtés. Vous avez encore tout l'avenir devant vous et je vous encouragerai à mon tour dans vos projets.

Merci à mon meilleur ami Jules d'avoir été à mes côtés depuis maintenant près de 12 ans. C'est toujours un immense plaisir d'être en ta compagnie le soir avec Boar Gaming, une équipe qui se fera sans doute connaître dans les futurs tournois d'E-sport.

J'aimerais finalement remercier les Drs. Jean-Philippe Gratton, Mathieu Ferron et Bruce Allen d'avoir accepté de réviser mon mémoire de maîtrise. Le temps que vous m'accordez est grandement apprécié.

Chapitre 1. Introduction

1.1 Les maladies cardiovasculaires

Les maladies cardiovasculaires telles que l'hypertension artérielle, l'insuffisance cardiaque, l'infarctus du myocarde et les maladies coronariennes causent le décès de plus de 17 millions d'individus par année (World Health Organization, 2014). Elles représentent plus de 30% des décès totaux et est donc la principale cause de mortalité dans le monde (Mozaffarian et al., 2016). L'organisation mondiale de la santé (OMS) attribue le développement de ces maladies cardiovasculaires à plusieurs facteurs de risques dans la population. Les maladies du cœur sont notamment fortement associées à de multiples facteurs de risques modifiables et non modifiables. Considérant les coûts excessivement élevés que les maladies cardiovasculaires engendrent sur le système de santé au Canada (Tarride et al., 2009), elles constituent un problème majeur et une priorité pour la santé publique.

1.1.1 Les facteurs de risque

D'une part, parmi les facteurs de risques modifiables on note entre autres le tabagisme, l'alcoolisme, l'inactivité physique ainsi qu'une diète inappropriée (Mendis et al., 2011). L'usage de tabac par environ un milliard d'individus dans le monde représente le facteur de risque le plus évitable causant environ 10% des maladies cardiovasculaires (World Health Organization, 2009). De plus, l'inactivité physique, qui a une forte prévalence dans les pays à haut revenu où les habitants ont un mode de vie plus sédentaire, représente un facteur déterminant dans le développement des maladies coronariennes (Shiroma & Lee, 2010). L'inactivité physique ainsi

qu'une diète inappropriée sont les deux principales causes menant à l'obésité et peuvent entraîner de graves conséquences au niveau métabolique, comme le développement du diabète de type 2 ou de l'athérosclérose. En outre, l'usage excessif d'alcool constitue un risque dans le développement d'arythmies cardiaque et de l'hypertension tout en ayant de graves effets sur le foie (Mendis et al., 2011).

D'autre part, les facteurs non-modifiables tels que l'âge, le sexe ou des facteurs génétiques contribuent également au risque cardiovasculaire. Par exemple, une personne ayant des parents souffrant d'une maladie cardiovasculaire présente un risque cardiovasculaire plus élevé (Kathiresan & Srivastava, 2012). À ces facteurs s'ajoutent des facteurs socio-économiques tels que le revenu moyen ainsi que l'éducation (Gersh et al., 2010). Alors que les maladies coronariennes constituent un problème dans la majorité des pays en développement (Gaziano et al., 2010), la sédentarité qui s'est installée dans les pays plus industrialisés augmente significativement les risques d'obésité et de diabète (Mendis et al., 2011). De façon intéressante, une récente étude a montré un lien significatif entre le nombre élevé d'heures travaillées et l'incidence des maladies coronariennes et d'accident vasculaire cérébral (Kivimaki et al., 2015), suggérant d'autant plus un rôle important du statut socio-économique dans le développement de maladies cardiovasculaires.

1.1.2 L'hypertrophie cardiaque et l'insuffisance cardiaque

L'insuffisance cardiaque constitue une maladie cardiovasculaire très répandue. Elle est définie comme étant l'incapacité du cœur à pomper un volume de sang nécessaire à la demande systémique (Jessup & Brozena, 2003). Touchant plus de 500 000 canadiens (Hunt et al., 2005), l'insuffisance cardiaque se reconnaît par de multiples symptômes tels que l'essoufflement, l'orthopnée, la dyspnée paroxystique ainsi que la fatigue (Jessup & Brozena, 2003). Elle est d'abord induite par des stimuli pathologiques tels que l'ischémie ou l'infarctus du myocarde, qui induisent d'abord une phase d'hypertrophie compensatoire du muscle destinée à augmenter la capacité de pompage du cœur (Heineke & Molkenin, 2006) (**Figure 1.1**). L'hypertrophie cardiaque, caractérisée par une augmentation de la taille des cardiomyocytes, constitue d'abord une réponse adaptative en réponse à un stress induit par une modification de pression ou de volume (Frey et al., 2004). Ceci dit, à long-terme, un stress prolongé induit par ces stimuli risque de provoquer une hypertrophie pathologique (Berenji et al., 2005), un facteur de risque propice au développement de l'insuffisance cardiaque (Haider et al., 1998).

En outre, l'hypertrophie cardiaque peut également constituer une réponse physiologique lors de l'exercice et de la grossesse (Shimizu & Minamino, 2016). À l'inverse d'une hypertrophie pathologique, une hypertrophie physiologique présente une augmentation proportionnelle de la taille de la chambre du cœur et des fibres. Alors qu'une hypertrophie physiologique présente une augmentation de la longueur des myocytes plus importante que la largeur, une hypertrophie pathologique présente une augmentation de la largeur plus importante que la longueur. Elle peut à long-terme devenir excentrique et présenter une dilatation cardiaque importante et une diminution de la fonction du cœur (Heineke & Molkenin, 2006).

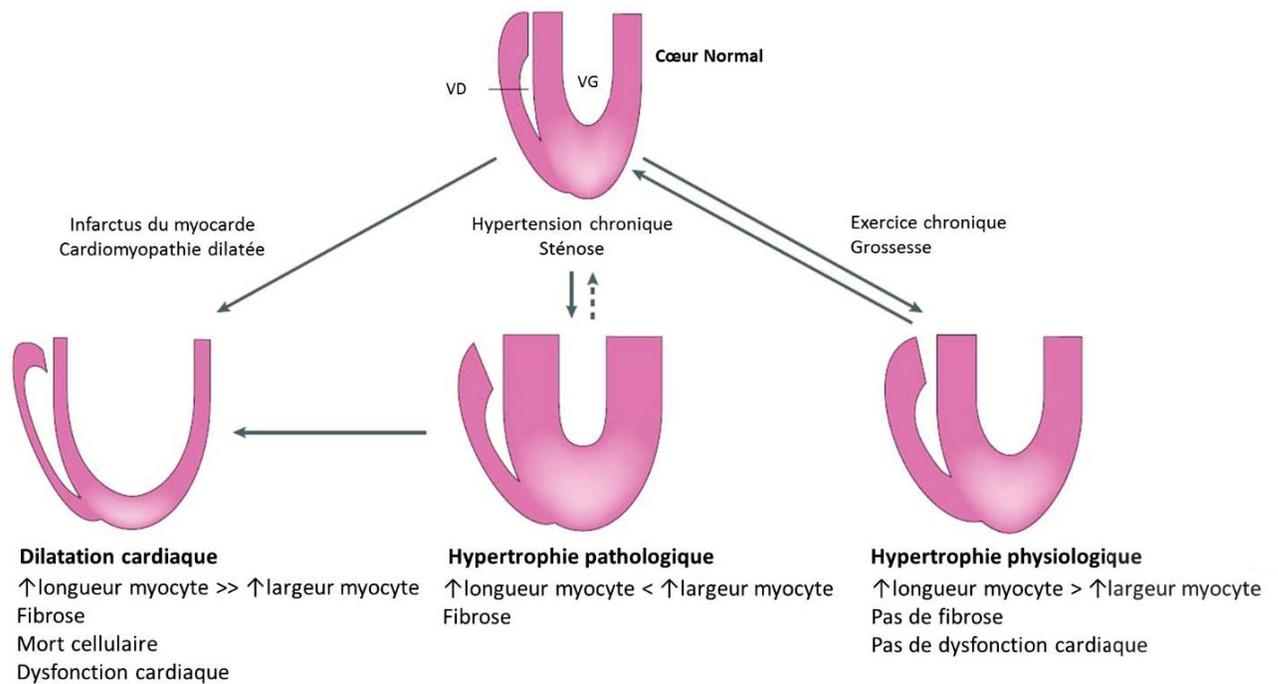


Figure 1.1. Différents types d’hypertrophie cardiaque. Des stimuli comme l’hypertension ou la sténose induisent à long-terme une hypertrophie pathologique du cœur caractérisée par une augmentation de la longueur des myocytes supérieure à l’augmentation de leur largeur et par de la fibrose. Cette hypertrophie induit éventuellement un remodelage caractérisé par une dilatation cardiaque, une condition qui favorise le développement de la fibrose et la mort cellulaire et dans laquelle le cœur présente une fonction grandement réduite. Contrairement à l’hypertrophie pathologique, l’hypertrophie physiologique, causée entre autres par l’exercice chronique ou la grossesse, présente une augmentation proportionnelle de la chambre du cœur et des fibres, et ne présente pas de fibrose ou de dysfonction cardiaque. VD, ventricule droit; VG, ventricule gauche. Adapté de Heineke et Molkenin, 2006 avec la permission de Nature Publishing Group.

1.2 La signalisation intracellulaire

De multiples voies de signalisation jouent un rôle critique dans le développement de l'hypertrophie cardiaque via l'activation d'effecteurs favorisant la croissance des cardiomyocytes. En effet, le stress mécanique ainsi que plusieurs ligands tels que des facteurs de croissance activent des récepteurs situés à la membrane des cardiomyocytes, induisant l'activation de voies de signalisation intracellulaires (Heineke & Molkentin, 2006). Un message extracellulaire entraîne donc l'activation d'une série de protéines (i.e. enzymes et substrats), menant ultimement au remodelage de l'expression des gènes impliqués dans la croissance des cellules cardiaques. Les protéines kinases et les protéines phosphatases régulent l'état de phosphorylation de ces substrats intracellulaires ; elles sont donc responsables de contrôler leur activité.

1.2.1 Les protéines kinases

Les protéines kinases sont des enzymes qui catalysent la phosphorylation de substrats à partir d'adénosine triphosphate (ATP). L'ajout d'un groupement phosphate aux protéines constitue une modification importante puisqu'elle induit souvent l'activation ou l'inactivation du substrat, influençant ainsi de multiples mécanismes cellulaires (Zhihong Wang & Cole, 2014). Il existe plus de 500 kinases chez l'humain et elles jouent un rôle critique dans la régulation des signaux de transduction cellulaires. Ainsi, des mutations modifiant l'expression ou la fonction des protéines kinases causent une altération dans l'activation des voies de signalisations intracellulaires, et ceci constitue un mécanisme critique dans le développement de pathologies chez l'humain (G. Manning et al., 2002).

Les protéines kinases sont classées en fonction de leur spécificité, soit les kinases sérine/thréonine-spécifiques, phosphorylant les résidus sérines et thréonines, les protéines tyrosine kinases (PTK), phosphorylant les résidus tyrosines, ainsi que les protéines kinases à double spécificité, phosphorylant les résidus tyrosines, sérines et thréonines. D'une part, les kinases sérine/thréonine-spécifiques incluent plusieurs kinases, telles que les *mitogen-activated protein kinases* (MAPKs), les *cyclin-dependent kinases* (CDKs), les protéines kinases C (PKCs), ou encore la calmoduline kinase II (CaMKII), et régulent de nombreuses fonctions à l'intérieur de la cellule (Kostich et al., 2002). Par exemple, les MAPKs participent à l'activation de multiples voies de signalisation contrôlant la prolifération, la différenciation, la survie cellulaire ainsi que l'expression génique. Un déséquilibre dans l'activation dans ces voies de signalisation est d'ailleurs associé au développement de plusieurs cancers (M. A. Lemmon & J. Schlessinger, 2010). Par ailleurs, CaMKII participent à l'homéostasie du calcium intracellulaire et cibles plusieurs protéines importantes dans la régulation de la signalisation du calcium et dans le couplage excitation-contraction du cœur (Couchonnal & Anderson, 2008).

D'autre part, les PTKs, qui incluent des récepteurs à activité tyrosine kinase (RTKs) et les nrTKs (*non-receptor tyrosine kinases*), sont essentiels à l'activation de voies de signalisation intracellulaires et régulent la prolifération, la différenciation et la migration cellulaire (Hubbard & Till, 2000). La famille des RTKs est constituée de récepteurs qui transmettent le signal de nombreux facteurs de croissance tels que l'EGF, le FGF (*fibroblast growth factor*), le PDGF (*platelet-derived growth factor*), le VEGF (*vascular endothelial growth factor*) ainsi que le NGF (*nerve growth factor*) (Mark A. Lemmon & Joseph Schlessinger, 2010). En outre, les nrTKs forment une grande famille qui incluent de nombreuses kinases telles que les janus kinases (JAKs), importantes dans la signalisation des cytokines, et le proto-oncogène c-Src.

Elles permettent la transmission de la signalisation initiée par les RTKs et d'autres récepteurs tels que les RCPGs. La plupart des PTKs sont couplés à une protéine tyrosine phosphatase (PTP), qui catalyse la déphosphorylation d'une protéine cible, ce qui permet de maintenir un équilibre de phosphorylation des substrats et l'activation des voies de signalisation intracellulaires (section 1.3) (Mark A. Lemmon & Joseph Schlessinger, 2010).

Enfin, les kinases à double spécificité, qui ciblent les tyrosines, sérines et thréonines, constituent un petit groupe de kinases incluant MEK1/2 (*MAPK/ERK kinase 1/2*) qui phosphorylent spécifiquement les MAPKs (Roskoski, 2012). En outre, les kinases DYRKs (*dual specificity tyrosine phosphorylation regulated kinase*), qui sont capables de s'autophosphoryler en tyrosine puis d'activer des substrats en phosphorylant leurs sérines et thréonines, jouent un rôle important dans la signalisation et la prolifération cellulaire (Walte et al., 2013).

1.2.2 Les RTKs et les MAPKs

Les récepteurs à activité tyrosine kinase sont des récepteurs transmembranaires possédant un domaine extracellulaire liant leur ligand respectif, ainsi qu'un domaine intracellulaire à activité tyrosine kinase permettant la transduction de signaux intracellulaires. Suite à leur activation, les RTKs se dimérisent et procèdent à une autophosphorylation des résidus tyrosine de leur domaine intracellulaire, ce qui crée de nouveaux sites d'interactions et permet le recrutement de diverses protéines sur le récepteur et l'activation de voies de signalisation intracellulaires (Mark A. Lemmon & Joseph Schlessinger, 2010).

Le facteur de croissance épidermique (EGF, *epidermal growth factor*) est un exemple de ligand qui lie son récepteur (Récepteur à l'EGF, EGFR) faisant partie de la famille des RTKs (**Figure 1.2**). Suite à la liaison à son ligand, l'EGFR passe d'une forme monomérique inactive

à une forme dimérique active, puis procède à l'autophosphorylation de son domaine intracellulaire (Oda et al., 2005). Ceci permet le recrutement de GRB2 (*growth factor receptor-bound protein 2*), une protéine adaptatrice permettant l'activation de la protéine G Ras (Kozer et al., 2014). Les protéines G sont des protéines qui lient et hydrolysent le GTP (guanosine triphosphate) en GDP (guanosine diphosphate), afin de transmettre un signal à l'intérieur de la cellule. Alors que les protéines G hétérotrimériques formées de trois sous-unités (α , β , γ) sont activées par les récepteurs couplés aux protéines G, les petites GTPase monomérique telles que Ras sont homologues à la sous-unité α des protéines G hétérotrimériques et s'activent de façon indépendante (Oldham & Hamm, 2008).

Ainsi, une fois liée au GTP, la protéine Ras induit l'activation d'un de ses effecteurs cellulaires, l'enzyme Raf-1, ainsi que l'activation en chaîne de multiples protéines kinases, les MAPKs. En effet, Raf-1 est une MAPK kinase kinase (MAPKKK) qui catalyse la phosphorylation d'une MAPK kinase (MAPKK) qui a à son tour pour rôle de phosphoryler une MAPK, la protéine kinase ERK1/2 (*extracellular signal-regulated kinase 1 et 2*). La phosphorylation en chaîne des MAPKs induit ultimement l'activation de facteurs de transcription intranucléaires notamment impliqués dans le remodelage des gènes cardiaques (Heineke & Molkentin, 2006). MEK1/2 sont de bons exemples de MAPKKs favorisant l'activation d'ERK1/2, des MAPKs qui ont été montrées pour favoriser la croissance hypertrophique chez la souris (Bueno et al., 2000). Ainsi, les RTKs sont connus pour jouer un rôle dans la croissance, la différenciation et la prolifération cellulaire dans le cœur (Wheeler-Jones, 2005). En ce sens, connaissant le potentiel oncogénique de la protéine Ras, les RTKs favorisent la progression de plusieurs cancers (Normanno et al., 2006).

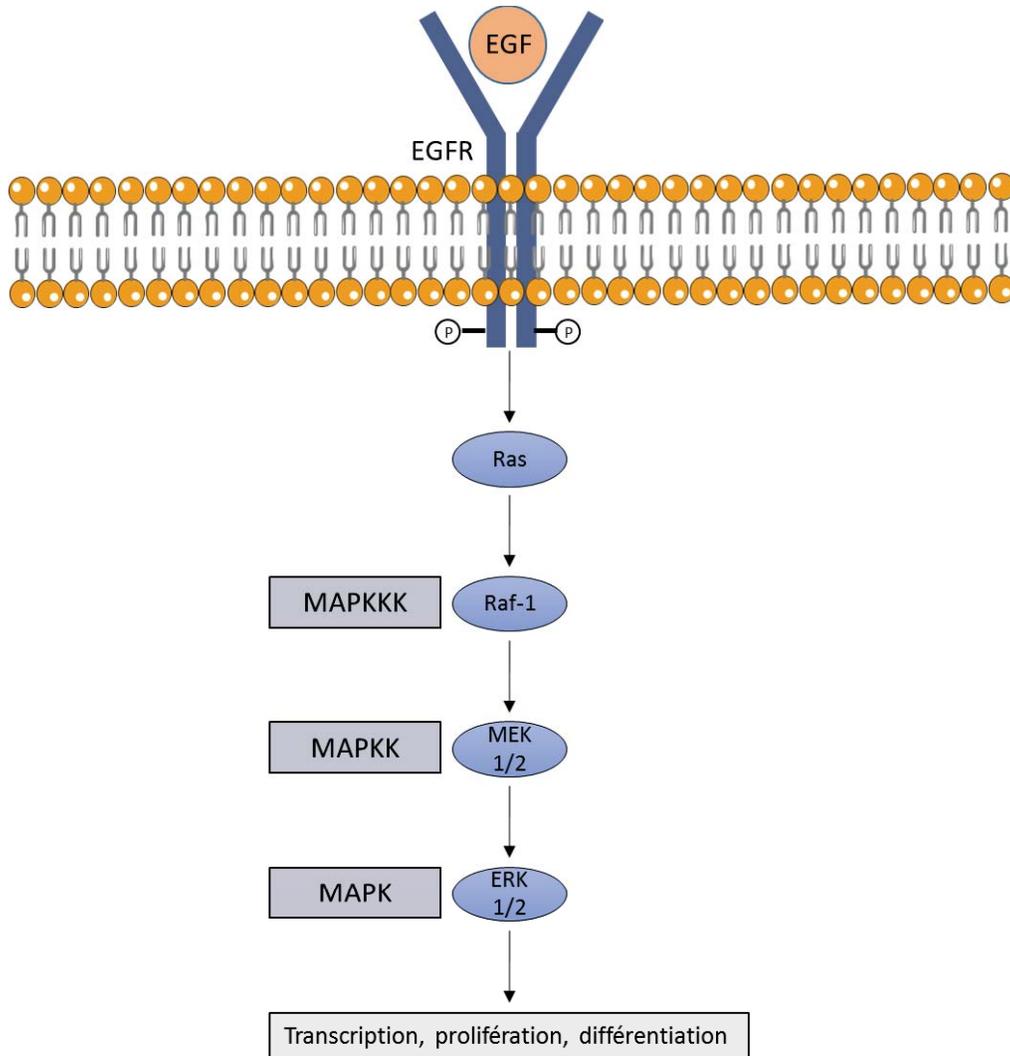


Figure 1.2. La signalisation de l'EGFR. Suite à la liaison de l'EGF à l'EGFR, celui-ci passe d'une forme monomérique inactive à une forme dimérique active. Par autophosphorylation, il phosphoryle son domaine intracellulaire, puis induit, entre autres, l'activation de la protéine G Ras. Ceci mène à l'activation de la voie des MAPKs, soit Raf-1, une MAPKKK, MEK 1/2, des MAPKKs, puis ERK 1/2, des MAPKs. Ultimement, l'activation en chaîne de ces substrats intracellulaires favorise la transcription, la prolifération et la différenciation cellulaire grâce à l'activation de facteurs de transcription intranucléaires.

1.2.3 La voie PI3K-PKB

L'activation de RTKs par des facteurs de croissance tels que l'EGF ou l'*insulin-like growth factor-1* (IGF-1) induit l'activation de la PI3K (phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase) (Ojeda et al., 2011; Oudit et al., 2004). Par la suite, PI3K phosphoryle le PIP₂ (phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate), générant du PIP₃ (phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate). Cette réaction peut être inhibée par PTEN (*phosphatase and tensin homolog*), une phosphatase qui déphosphoryle le PIP₃ en PIP₂. À la membrane plasmique, le PIP₃ recrute la protéine kinase B (PKB/AKT) et PDK1 (*phosphoinositide-dependent kinase-1*), permettant à cette dernière de phosphoryler et activer PKB (B. D. Manning & Cantley, 2007).

Afin d'être complètement activé, PKB doit être phosphorylé sur la sérine 473 et sur la thréonine 308 (Alessi et al., 1996). Alors que PDK1 permet la phosphorylation de la thréonine 308 (Vivanco & Sawyers, 2002), la phosphorylation de la sérine 473 peut être catalysée par de multiples enzymes, telles que la *DNA-dependent protein kinase* (DNA-PK) et la *mammalian target of rapamycin complex 2* (mTORC2) (Sarbassov et al., 2005). En outre une étude récente suggère également que la phosphorylation de PKB sur la sérine 477 et la thréonine 479 par la *cyclin-dependent kinase 2* (CDK2) ou par mTORC2 serait essentielle à son activation, puisqu'elle faciliterait et compenserait la phosphorylation de la sérine 473 (P. Liu et al., 2014).

Une fois activé, PKB initie la phosphorylation et l'activation de multiples substrats intracellulaires ayant un rôle dans le métabolisme, la prolifération et la survie cellulaire (Song, Ouyang, & Bao, 2005). De plus, plusieurs études ont démontré que la signalisation de PKB influence le développement de plusieurs pathologies (Hers, Vincent, & Tavaré, 2011). Par exemple, une suractivation de la voie PI3K-PKB favorise le développement de certains cancers

(Altomare & Testa, 2005). Au niveau cardiovasculaire, l'activation de PKB en conditions physiologiques permet le développement de l'hypertrophie physiologique compensatoire, lui conférant un rôle protecteur, alors qu'une surexpression à long terme devient délétère (Heineke & Molkentin, 2006). En outre, puisque PKB active plusieurs facteurs de transcriptions impliqués dans la croissance du cœur, tels que GATA4, c-Myc et NFAT, cette protéine constitue une cible thérapeutique intéressante dans le traitement de l'hypertrophie cardiaque (Hers et al., 2011).

1.2.4 Les récepteurs couplés aux protéines G

Les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) sont des récepteurs possédant 7 passages transmembranaires dont le rôle principal est de transmettre un signal intracellulaire suite à sa liaison à un ligand extracellulaire (Kobilka, 2007). L'angiotensine II (ANG II) et l'endothéline-1 (ET-1) sont deux exemples de ligands qui activent respectivement le récepteur à l'angiotensine II de type 1 (AT₁R) et les récepteurs à l'endothéline de types A (ETAR) et B (ETBR), des RCPGs couplés à des protéines G_q impliqués dans l'activation de la phospholipase C beta (PLC-β). L'activation de la PLC-β induit ensuite la formation de diacylglycérol (DAG) et d'inositol-1,4,5-triphosphate (IP₃). La formation d'IP₃ induit l'activation de voies liées au calcium (Ca²⁺) via l'activation de la calcineurine et du *nuclear factor of activated T-cells* (NFAT) (Heineke & Molkentin, 2006; Salazar, Chen, & Rockman, 2007). Il a d'ailleurs été démontré que NFAT permet le remodelage des certains gènes impliqués dans l'hypertrophie cardiaque lorsqu'il est transloqué au noyau (Wilkins & Molkentin, 2004).

1.2.5 Transactivation de l'EGFR par les récepteurs couplés aux protéines G

Les RTKs et les RCPGs constituent deux familles de récepteurs qui transmettent de nombreux signaux à l'intérieur de la cellule. De nombreuses études décrivent un mécanisme par lequel les RCPGs activent les RTKs par transactivation. Ce mécanisme a d'abord été proposé par Daub et al. qui ont montré une augmentation de la phosphorylation et de l'activation de l'EGFR suite à une stimulation de cellules avec l'ET-1, un agoniste connu de RCPGs (Daub et al., 1996). Ceci était vrai dans plusieurs types de cellules et de protéines G (Daub et al., 1997).

Un premier mécanisme proposé suggère que des métalloprotéases (MMPs) membranaires, qui sont activées par des RCPGs, clivent des ligands comme le HB-EGF (*heparin-binding EGF-like growth factor*) qui, une fois coupé, interagit avec son récepteur, l'EGFR, et induit son activation (Z. Wang, 2016). Un autre mécanisme soutient plutôt une activation de l'EGFR sans impliquer de ligand. En effet, les RCPGs activeraient des PTKs cellulaires telles que c-Src qui peuvent ensuite phosphoryler l'EGFR sur ses domaines intracellulaires et l'activer (Cattaneo et al., 2014). Plusieurs mécanismes permettent aux RCPGs d'activer les PTKs. Par exemple, les RCPGs peuvent induire l'activation des NOXs membranaires et augmenter la production de ROS qui inactivent les PTPs et favorisent donc la signalisation des PTKs (Cattaneo et al., 2011). La transactivation des RTKs par les RCPGs a été principalement étudiée chez l'EGFR, mais elle a aussi été montrée pour les récepteurs du PDGF, (Heeneman et al., 2000), de l'IGF (Oligny-Longpre et al., 2012), du VEGF (Tanimoto, Jin, & Berk, 2002) et du FGF (Rauch et al., 2004).

1.2.6 Le stress mécanique

Le stress cellulaire causé par l'étirement mécanique des myocytes transmet un changement morphologique via des senseurs membranaires, constitués principalement d'intégrines, ce qui cause la relâche et l'activation de nombreux ligands et facteurs de croissance, tels que l'ANG II, l'ET-1 et le TGF- β (*Transforming growth factor beta*) qui peuvent à leur tour activer de multiples voies de signalisation intracellulaires (Israeli-Rosenberg et al., 2014). La liaison de ceux-ci à des récepteurs situés à la surface de la membrane des cardiomyocytes active des voies de signalisations impliquées dans le développement de l'hypertrophie cardiaque. La mélusine est un exemple d'intégrine impliquée lors du stress mécanique dans le myocyte cardiaque (Brancaccio et al., 2003). Le stress mécanique est un signal important du développement de l'hypertrophie cardiaque. Par exemple, en réponse à l'hypertension artérielle, les cellules cardiaques du ventricule gauche sont soumises à un étirement mécanique qui induira l'activation des intégrines membranaires, de l'AT₁R, de l'EGFR et de Ras, menant ultimement au développement de l'hypertrophie (Ruwhof & van der Laarse, 2000).

1.2.7 Les protéines 14-3-3

Les protéines de la famille des 14-3-3 (β , ϵ , η , γ , τ , ζ et σ) sont des protéines ubiquitaires importantes dans la régulation de multiples processus cellulaires (Wilker & Yaffe, 2004). Ces protéines échafaud agissent sous forme de dimère, leur permettant de jouer un rôle adaptateur en interagissant avec de multiples protéines cibles phosphorylées en sérine ou en thréonine et qui contiennent le motif consensus de reconnaissance RSXpS/TXP ou RXXXpS/TXP (Obsil & Obsilova, 2011). Des analyses par chromatographie d'affinité ont permis d'identifier plus de 200 ligands des 14-3-3 impliqués dans différents processus intracellulaires importants comme la signalisation cellulaire, l'apoptose, la synthèse protéique, le métabolisme réducteur ainsi que la régulation de facteurs de transcriptions (Pozuelo Rubio et al., 2004).

Par leur habilité à lier les résidus phosphosérines et phosphothréonines, les 14-3-3 constituent des modulateurs importants de la signalisation intracellulaire. En effet, Raf-1 est une cible très connue des 14-3-3 qui peuvent activer ou inhiber sa fonction en interagissant avec 4 de ses sites phosphorylés (Mackintosh, 2004). De plus, les 14-3-3 peuvent bloquer l'activation des kinases JNK (*c-Jun N-terminal kinases*) et p38, suggérant d'autant plus un rôle important de ces protéines adaptatrices dans la régulation des MAPKs (Xing et al., 2000). De façon intéressante, une déplétion des 14-3-3 semble favoriser le stress oxydatif du cœur et l'inflammation dans des souris diabétiques (Thandavarayan et al., 2011) tout en stimulant la réponse hypertrophique et la fibrose (Gurusamy et al., 2005), et provoque la dysfonction cardiaque chez la souris suite à un infarctus, suggérant un rôle protecteur important des 14-3-3 au cœur (Sreedhar et al., 2016).

En outre, l'isoforme 14-3-3 σ interagit avec de multiples protéines impliquées dans le développement des cancers. En effet, celle-ci induit la tétramérisation et l'activation de

l'oncogène p53, ce qui suggère qu'elle pourrait constituer une bonne cible thérapeutique dans le traitement de certains cancers (Wilker & Yaffe, 2004).

1.3 Les phosphatases

Les phosphatases sont des enzymes qui catalysent la déphosphorylation de protéines et donc qui enlèvent leur groupement phosphate, à l'inverse des protéines kinases qui phosphorylent ces substrats. La phosphorylation est une modification post-traductionnelle qui est maintenue en équilibre par ces deux types d'enzymes, et qui régule plusieurs mécanismes cellulaires. On classe les phosphatases en 3 familles distinctes, soit les sérine/thréonine phosphatases (PP), les phosphatases haloacides déhalogénases (HAD) et les protéines tyrosine phosphatases (PTPs) (**Figure 1.3**), qui diffèrent dans leur structure et leur mécanisme d'action (Tonks, 2006).

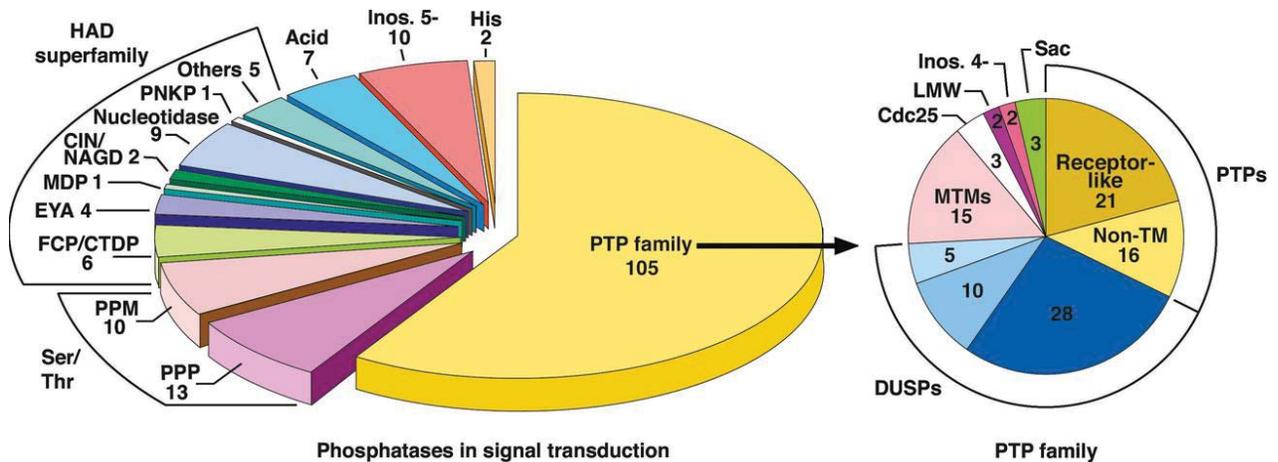


Figure 1.3. Les familles des protéines phosphatases. On classe les phosphatases en 3 grandes familles. La famille des PP (Ser/Thr) catalyse spécifiquement la déphosphorylation des résidus sérine et thréonine, et inclue des phosphoprotéines phosphatases P (PPP) et M (PPM). Les phosphatases HAD catalysent la déphosphorylation de leurs substrats grâce à un résidu aspartate. Les PTPs constituent la plus grande famille des phosphatases et comportent plus de 105 phosphatases. Celles-ci incluent les PTPs classiques spécifiques aux résidus tyrosines, ainsi que les phosphatases à double-spécificité (DUSPs), qui déphosphorylent les sérines, thréonines et tyrosines. Les PTPs classiques incluent des membres récepteurs et non-récepteurs. Reproduit de Tonks, 2013 avec la permission de FEBS PRESS.

1.3.1 Les sérine/thréonine phosphatases

Les PPs forment une famille de phosphatases qui déphosphorylent spécifiquement les sérines et thréonines. Contrairement aux autres familles de phosphatases, elles sont constituées de plusieurs sous-unités catalytiques et régulatrices (Shi, 2009). La famille des PPs comporte de multiples phosphatases chez l'humain (PP1-PP7) et joue un rôle important dans la régulation de plusieurs mécanismes cellulaires tels que la régulation de l'expression génique, l'apoptose, la réplication de l'ADN et le métabolisme du glycogène (Pereira, Vasconcelos, & Antunes, 2011). Notamment, la protéine phosphatase 1 (PP1) est une phosphoprotéine P (PPP) bien connue pour son rôle dans la régulation du métabolisme du glycogène. En effet, elle active la glycogène synthase et inactive la phosphorylase kinase lorsqu'elle les déphosphoryle, diminuant ainsi la dégradation du glycogène et favorisant sa synthèse (Aggen, Nairn, & Chamberlin, 2000).

La protéine phosphatase 2 (PP2A) est un autre exemple de PPP qui participe dans la signalisation intracellulaire (Wlodarchak & Xing, 2016). En effet, elle régule de multiples

signaux de transduction en déphosphorylant plusieurs substrats tels que Raf-1, MEK1/2 et PKB (Xu et al., 2006). De façon intéressante, elle peut réguler négativement ou positivement la voie des MAPKs. En empêchant l'activation de Ras (Ugi et al., 2002) et en inactivant ERK par déphosphorylation (Letourneux, Rocher, & Porteu, 2006), PP2A inhibe la voie des MAPKs. Raf-1 constitue également un de ses substrats et lorsqu'elle le déphosphoryle, elle effectue plutôt une régulation positive (Jaumot & Hancock, 2001).

PP2A régule de nombreux autres mécanismes puisqu'elle possède plus de 300 substrats. Elle régule toutes les étapes du cycle cellulaire en plus de jouer un rôle dans la suppression tumorale. En outre, la microcystine et l'acide okadaïque sont deux inhibiteurs connus de PP1 et PP2A couramment utilisés en laboratoire (Wlodarchak & Xing, 2016).

1.3.2 Les phosphatases HAD

Les membres de la famille des phosphatases haloacides déhalogénases (HAD) catalysent la déphosphorylation de leurs substrats via un résidu aspartate situé dans leur site catalytique qui permet une attaque nucléophile sur leurs cibles, contrairement aux PTPs qui exercent leur activité grâce à une cystéine. Cette famille comporte environ 40 phosphatases qui déphosphorylent une variété de substrats incluant des protéines, des glucides, des lipides, des métabolites et l'ADN, et elles sont impliquées dans multiples pathologies chez l'humain comme les cancers et les maladies cardiovasculaires (Seifried, Schultz, & Gohla, 2013). Par exemple, les phosphatases EYA (*eyes absent*) sont importantes dans la formation des organes et une mutation de ces protéines peut induire des maladies congénitales (Jemc & Rebay, 2007). Par ailleurs, la phosphoglycolate phosphatase catalyse la déphosphorylation du 2-phosphoglycolate lors de la réparation de l'ADN et elle est régulée par les ROS (Seifried et al., 2014).

1.3.3 Les PTPs

Le prix Nobel de physiologie et médecine de 1992 a été décerné à Edwin Gerhard Krebs et son collaborateur Edmond Henri Fischer pour la découverte et la caractérisation dans les années 50 de la phosphorylation réversible des protéines ainsi que de son importance dans la régulation des mécanismes cellulaires (Fischer, 1993; Krebs, 1993; Raju, 2000). L'impact de la phosphorylation sur la régulation des mécanismes physiologiques a évidemment attiré l'attention de la communauté scientifique sur l'étude de la phosphorylation par les protéines kinases. Depuis, de multiples études ont montré un rôle crucial des protéines kinases dans la signalisation cellulaire (G. Manning et al., 2002). C'est en 1988 que la première PTP, la protéine tyrosine phosphatase 1B (PTP1B) (voir section 1.3.3.1.1) a été purifiée et caractérisée à partir de tissus de placenta humain par les Drs. Nicholas Tonks et Edmond Fischer (Tonks, Diltz, & Fischer, 1988). Bien que PTP1B soit la PTP la mieux caractérisée à ce jour, de nombreuses autres phosphatases de la superfamille des PTPs ont été étudiées et caractérisées depuis (Tonks, 2013).

En effet, les PTPs constituent la plus grande famille de gènes encodant des phosphatases, et comprend plus de 100 phosphatases différentes (Tonks, 2006). Bien qu'elles aient été initialement perçues comme étant des enzymes non-spécifiques, elles sont désormais bien établies comme étant des enzymes spécifiques agissant comme régulateurs essentiels des mécanismes cellulaires. En équilibre avec les PTKs, elles régulent l'activation de multiples voies de signalisation intracellulaires et participent donc dans la régulation de nombreuses réponses physiologiques (Tonks, 2013).

Comme les autres phosphatases, les PTPs possèdent une structure et un mécanisme d'action unique. En effet, toutes les PTPs classiques sont caractérisées par un motif consensus HCX₅R ([I/V]HCXXGXXR[S/T]) situé au centre de leur site catalytique. Ce motif contient un résidu cystéine qui possède un groupement thiolate (S⁻) agissant tel un nucléophile, ce qui permet de catalyser la déphosphorylation de résidus phosphorylés par l'enzyme (Tonks, 2006).

On divise la superfamille des PTPs en deux sous-familles. Alors que les PTPs classiques sont constituées de 37 phosphatases pouvant déphosphoryler spécifiquement les résidus tyrosines, les PTPs à double spécificité (DUSP, *dual-specificity phosphatases*) comprennent 68 phosphatases et déphosphorylent les sérines et thréonines en plus des tyrosines, et certains lipides et ARNs (Alonso et al., 2004). Étant donné leur capacité à réguler de multiples mécanismes intracellulaires, une altération de la fonction des PTPs contribue au développement de plusieurs pathologies chez l'humain (Li & Dixon, 2000).

1.3.3.1 Les PTPs classiques

D'abord, les PTPs classiques sont catégorisées en deux types, soit les récepteurs protéines tyrosine phosphatases (RPTPs) ainsi que les PTPs non-transmembranaires (nrPTPs, *non-receptor protein tyrosine phosphatases*) (Alonso et al., 2004). Puisque les RPTPs sont situés à la surface de la membrane, ils permettent de réguler la signalisation intracellulaire via des interactions à la surface de la cellule (Stoker, 2005). Plus spécifiquement, ils sont impliqués dans la régulation des interactions cellule-cellule ou entre la cellule et la matrice extracellulaire. Par exemple, la β -caténine est une protéine qui régule l'adhésion entre les cellules et il a été démontré que plusieurs RPTPs tels que PTPRF (*receptor-type tyrosine-protein phosphatase F*) (Kypta, Su, & Reichardt, 1996) et PTPRB (*receptor-type tyrosine-protein phosphatase beta*)

(Meng et al., 2000) déphosphorylent la β -caténine, ce qui altère son interaction avec la cadhérine essentielle à l'adhésion.

Ensuite, les nrPTPs incluent environ une quinzaine de PTPs dont PTP1B, TCPTP (*T-cell enriched protein tyrosine phosphatase*), SHP-2 (*Src homology region 2-containing protein tyrosine phosphatase 2*) et PTPH1 (*proteine tyrosine phosphatase non-receptor type 3*). Ces phosphatases possèdent un seul domaine catalytique accompagné de régions régulatrices adjacentes qui favorisent les interactions protéines-protéines importantes pour entre autres moduler l'activité de l'enzyme et déterminer sa localisation à l'intérieur de la cellule (Li & Dixon, 2000).

D'une part, TCPTP est une des premières PTPs à avoir été caractérisée et partage environ 72% de la séquence de son domaine catalytique avec celui de PTP1B. Elle peut déphosphoryler plusieurs substrats, dont l'EGFR, et inhibe l'activation de la voie de la PI3K et des janus kinases (JAKs) (Ibarra-Sanchez et al., 2000). D'autre part, SHP-2 constitue une phosphatase qui tend à activer les voies de signalisation intracellulaires plutôt que de les inactiver comme c'est le cas dans la grande majorité des PTPs. Cette phosphatase est impliquée dans l'activation de plusieurs voies de transduction comme celle des MAPKs suite à une stimulation de l'EGFR, PDGFR (*platelet-derived growth factor receptor*) ou du FGFR (*fibroblast growth factor receptor*) (Dance et al., 2008). Puisqu'elle participe directement à l'activation de ces voies, une hyperactivation de SHP-2 suite à une mutation peut faciliter la progression de certains cancers comme le cancer du sein (J. Zhang, Zhang, & Niu, 2015).

1.3.3.1.1 La protéine tyrosine phosphatase 1B

PTP1B est la première PTP qui a été purifiée et caractérisée. Elle représente donc un exemple de PTP prototypique et continue d'être étudiée afin de mieux comprendre la structure et la fonction d'autres PTPs ainsi que pour mieux comprendre son rôle dans le développement de pathologies humaines. Elle est exprimée dans plusieurs tissus et est située sur la face cytoplasmique du réticulum endoplasmique (Frangioni et al., 1992).

1.3.3.1.1.1 Structure de PTP1B

Cette enzyme a été la première PTP cristallisée, ce qui a permis de mieux comprendre comment fonctionnent les autres PTPs (Barford, Flint, & Tonks, 1994). Essentiellement, le domaine catalytique de PTP1B est composé de 8 hélices alpha et de 12 feuillets beta. Comme toutes les autres PTPs, PTP1B possède un motif conservé HCX₅R et celui-ci est situé à la base d'une voute formée de trois motifs (**Figure 1.4**). Le premier motif est formé par la boucle WPD qui consiste en une boucle conservée chez les PTPs dans laquelle un résidu aspartate (l'aspartate 181 chez PTP1B) est impliqué dans la catalyse (J. Yang et al., 2001). Le deuxième motif est formé par la boucle Q, comprenant la glutamine 262 qui constitue également un résidu essentiel à la catalyse. Le troisième motif est la boucle phosphotyrosine (pTyr) contenant la tyrosine 46. Cette dernière définit la spécificité de PTP1B envers les résidus phospho-tyrosines, puisqu'elle est située complètement à la base de son domaine catalytique qui, de par sa profondeur, n'est accessible que par les résidus phospho-tyrosines qui possèdent une chaîne latérale plus longue que celle des résidus phospho-sérines ou -thréonines (Tonks, 2003).

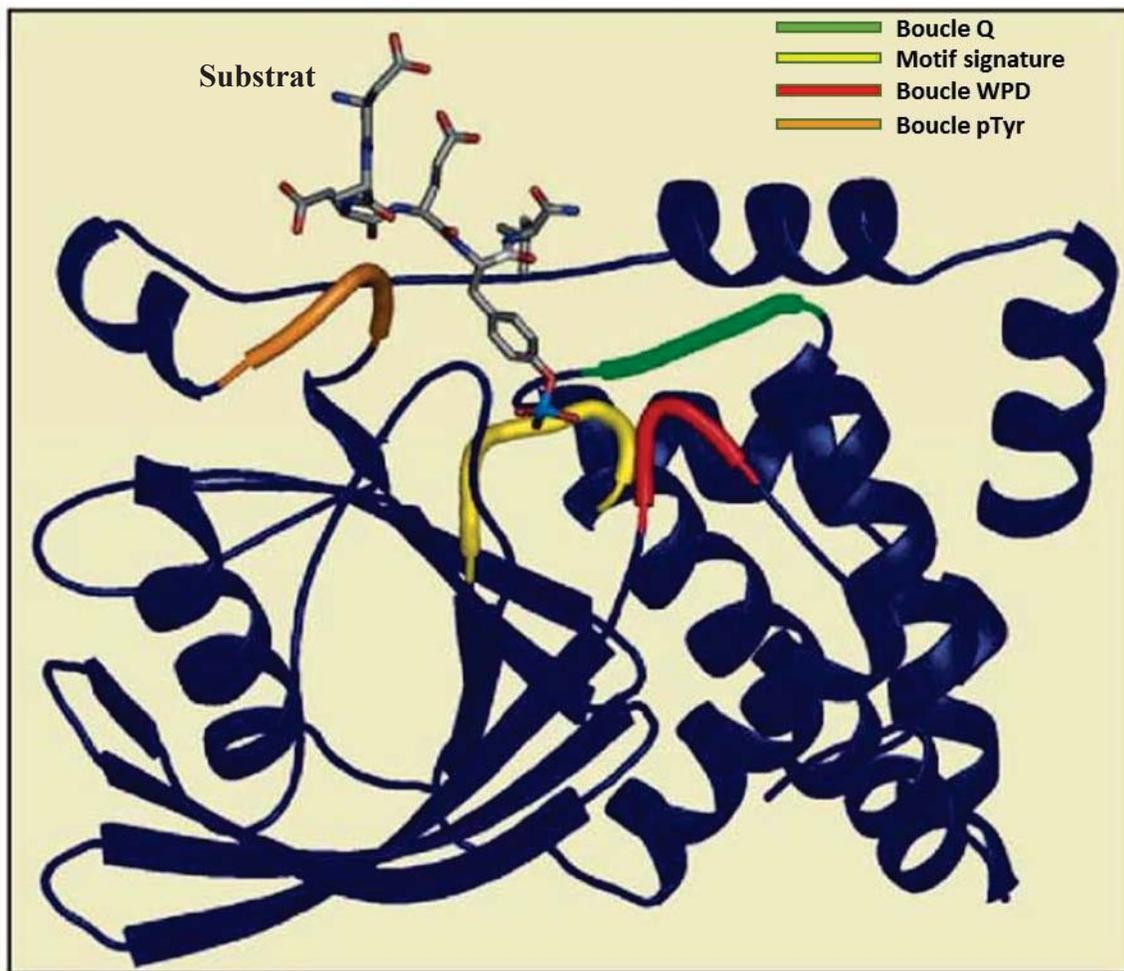


Figure 1.4. Structure du domaine catalytique de PTP1B. Le motif signature HCX₅R de PTP1B est situé à la base d'une voute composée de trois motifs, soit la boucle Q, la boucle WPD ainsi que la boucle phosphotyrosine (pTyr). Un substrat phosphorylé interagit avec PTP1B. Adapté de Tonks, 2003 avec l'autorisation de John Wiley and Sons.

1.3.3.1.1.2 Mécanisme d'action de PTP1B

La déphosphorylation par PTP1B s'effectue en deux étapes (**Figure 1.5**). D'abord, la cystéine 215 du motif signature de PTP1B effectue une attaque nucléophile sur le groupement phosphate de son substrat phosphorylé via son groupement thiolate (S⁻), pendant que l'aspartate

181 de PTP1B effectue une protonation de la tyrosine du substrat. Un intermédiaire cystéinyl-phosphate est alors formé, puis le groupement phosphate est relâché suite à une hydrolyse par une molécule d'eau qui est coordonnée par la glutamine 262 et l'aspartate 181 de PTP1B.

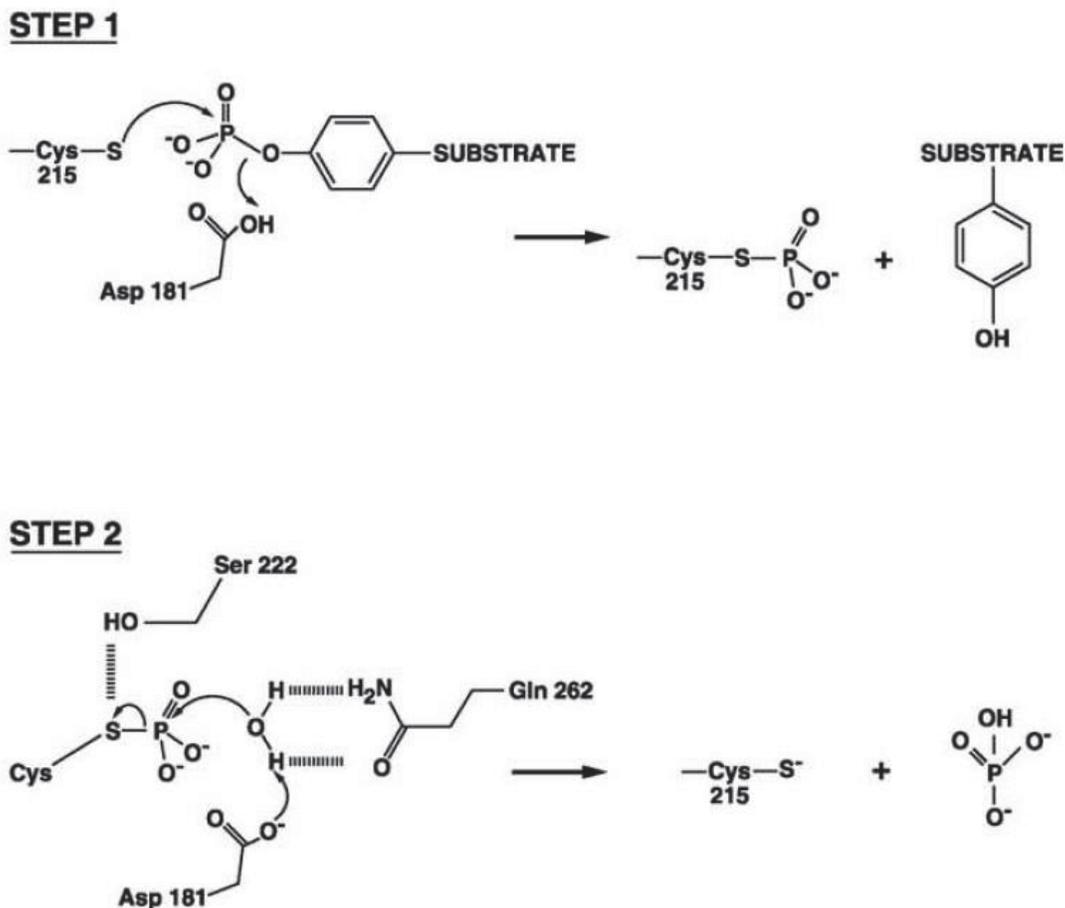


Figure 1.5. Mécanisme d'action de PTP1B. PTP1B catalyse la déphosphorylation de son substrat via un mécanisme en deux étapes. Lors de la première étape, la cystéine 215 de PTP1B effectue une attaque nucléophile sur le groupement phosphate de son substrat phosphorylé, menant à la formation d'un intermédiaire cystéinyl-phosphate. Le groupement phosphate est alors hydrolysé lors de la deuxième étape. Reproduit de Tonks, 2003 avec l'autorisation de John Wiley and Sons.

1.3.3.1.1.3 Les substrats de PTP1B

Plus de 30 cibles phosphorylées et 13 partenaires d'interaction de PTP1B ont été identifiés, mais plusieurs autres substrats potentiels ont été proposés (Feldhammer et al., 2013). En effet, en utilisant une plaque contenant plus de 6000 peptides phosphorylés mis en contact avec la phosphatase, un groupe a identifié plusieurs substrats potentiels qui pourraient être régulés par PTP1B (Ferrari et al., 2011). Néanmoins, les principaux substrats de PTP1B incluent de multiples protéines telles que des récepteurs activés par des facteurs de croissance, ainsi que des protéines cytoplasmiques (Bakke & Haj, 2015).

La cible la plus connue de PTP1B est le récepteur à l'insuline (IR), un RTK activé par l'insuline, l'IGF-1 et l'IGF-2. Suite à son activation, l'IR déclenche la phosphorylation de plusieurs substrats, menant au recrutement de protéines et à l'activation des voies de signalisation des MAPKs et de la PI3K. Ce signal permet à l'insuline d'effectuer ses actions métaboliques suite à une variation de la concentration de glucose dans le sang (Guo, 2014). De façon intéressante, PTP1B inactive l'IR en catalysant la déphosphorylation de deux résidus (Tyr 1162 et Tyr 1163) (Salmeen et al., 2000). Des études ont d'ailleurs montré une augmentation de la résistance à l'insuline et à l'obésité chez des souris homozygotes dont le gène codant pour PTP1B est inactivé (PTP1B $-/-$) (Elchebly et al., 1999; Klamann et al., 2000).

En plus de réguler l'IR, PTP1B inactive le substrat du récepteur à l'insuline 1 (IRS-1), une protéine adaptatrice transmettant le signal de l'IR suite à sa phosphorylation (Goldstein et al., 2000), et régule la signalisation de la leptine en interagissant avec JAK2 (Zabolotny et al., 2002). De plus, le récepteur à l'IGF-1 constitue lui aussi un substrat de PTP1B, qui régule négativement son activité (Kenner et al., 1996). Ensemble, ces données indiquent que PTP1B constitue une cible thérapeutique dans le traitement du diabète et de l'obésité (Cho, 2013).

Ensuite, PTP1B déphosphoryle d'autres récepteurs comme l'EGFR et le PDGFR, inhibant ainsi la phosphorylation subséquente de substrats intracellulaires en aval de ceux-ci. En ce sens, on observe une augmentation de la phosphorylation de l'EGFR, du PDFR ainsi que de leurs substrats dans des cellules PTP1B *-/-* (Haj et al., 2003; Milarski et al., 1993).

Enfin, en plus d'avoir des récepteurs comme substrats, PTP1B agit également sur plusieurs protéines cytoplasmiques. En effet, elle déphosphoryle et active le proto-oncogène c-Src, une PTK impliquée dans la progression de certains cancers (Parsons & Parsons, 2004). Il a d'ailleurs été montré que l'action de l'enzyme sur c-Src influence le développement du cancer du sein (Bjorge, Pang, & Fujita, 2000) et du colon (Zhu, Bjorge, & Fujita, 2007). PTP1B a également été montré pour réguler l'activité d'Argonaute 2 et des micro-ARNs permettant de réguler le silençage des gènes (M. Yang et al., 2014). D'autres exemples de substrats de PTP1B incluent entre autres TYK2 (Tyrosine kinase 2), un médiateur de la signalisation des cytokines (Myers et al., 2001), et la β -caténine (Balsamo et al., 1998).

1.3.3.1.1.4 Le rôle de PTP1B dans les pathologies humaines

Chaque PTP possède généralement plusieurs substrats spécifiques, leur conférant un rôle important dans la régulation de la phosphorylation, conjointement avec les PTKs. Les multiples cibles de PTP1B en font une cible thérapeutique intéressante dans le traitement de pathologies qui se développent en raison d'une dérégulation de ces voies de transduction. D'abord, l'importance de PTP1B dans la régulation de l'IR suggère qu'un inhibiteur de l'enzyme, permettrait à l'IR d'être activé plus fortement, ce qui constituerait un traitement potentiel du diabète et de l'obésité (Tamrakar, Maurya, & Rai, 2014; Zinker et al., 2002). D'ailleurs, la *low molecular weight protein tyrosine phosphatase* (LMPTP), une petite phosphatase d'environ 18

kDa (Raugei, Ramponi, & Chiarugi, 2002), est connue pour déphosphoryler l'IR (Chiarugi et al., 1997). Une récente étude a montré qu'une délétion spécifique au foie du gène codant pour LMW-PTP atténue le diabète induit chez la souris, et qu'une petite molécule inhibitrice de LMW-PTP améliore la condition de souris diabétiques en augmentant de façon significative la tolérance au glucose, la phosphorylation et la signalisation de l'IR (Stanford et al., 2017). Considérant le rôle des PTPs dans la signalisation de l'IR (Galic et al., 2005), une telle approche thérapeutique ciblant les PTPs pourrait être intéressante dans le traitement du diabète de type 2.

En outre, puisque PTP1B régule plusieurs voies de signalisation impliquées dans les cancers, inhiber ou activer la phosphatase permettrait de ralentir la progression de la maladie. Une meilleure compréhension de sa fonction sera cependant nécessaire puisqu'elle peut agir comme suppresseur de tumeur ou comme promoteur, dépendamment du contexte cellulaire (Lessard, Stuiblé, & Tremblay, 2010).

1.3.3.2 Les DUSPs

Les DUSPs sont représentées par environ 68 phosphatases et elles possèdent généralement un mécanisme d'action similaire aux PTPs, à l'exception que leur site actif accommode les sérines et thréonines en plus des tyrosines (Tonks, 2006). Les DUSPs les plus connues sont probablement les phosphatases à MAPKs (MKPs), qui déphosphorylent les kinases de la voie des MAPKs et constituent donc des régulateurs essentiels des voies des MAPKs comme ERK1/2 ou JNK (Boutros, Chevet, & Metrakos, 2008). Une autre classe de DUSP inclue le suppresseur de tumeur PTEN qui déphosphoryle le PIP₃ et régule négativement la signalisation de PKB (Yin & Shen, 2008).

1.4 Les dérivés réactifs de l'oxygène

Les ROS tels que le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$) et le radical hydroxyle ($OH\cdot$) sont produits suite au métabolisme aérobie. Le H_2O_2 est majoritairement formé par la mitochondrie, la principale source de ROS, durant le processus de phosphorylation oxydative, alors que l' $O_2^{\cdot-}$ est produit par les NOXs (*nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase*) membranaire suite à un transfert d'électrons du NADPH (forme réduite du *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*) à un atome d'oxygène (Holmstrom & Finkel, 2014). La SOD (superoxyde dismutase) est une enzyme catalysant la dismutation de l' $O_2^{\cdot-}$ en H_2O_2 (Fukai & Ushio-Fukai, 2011), alors que la catalase décompose le H_2O_2 en H_2O et agit donc comme antioxydant (Greenwald, 1990). De plus, lorsque les niveaux de H_2O_2 sont trop élevés, le $OH\cdot$ est formé en présence d'ion ferreux par la réaction de Fenton (Winterbourn, 1995). Les ROS sont également générés par des sources exogènes telles que le tabac, les polluants ou l'hyperoxie. Dépendant du contexte cellulaire, ils peuvent causer des dommages à la cellule tout en étant jouant un rôle régulateur (Holmstrom & Finkel, 2014).

1.4.1 Les ROS comme régulateurs de la transduction intracellulaire

Les ROS étaient initialement caractérisés comme étant des molécules délétères pour la cellule en raison du dommage oxydatif qu'elles effectuent sur les protéines, les lipides et l'ADN. D'ailleurs, le stress oxydatif, causé par des niveaux de ROS trop élevés par rapport aux antioxydants, favorise le développement de plusieurs maladies chez l'humain comme l'athérosclérose, plusieurs cancers ainsi que le diabète (Schieber & Chandel, 2014). Cependant, les ROS sont maintenant mieux connus comme étant des régulateurs de voies de transduction

impliquées dans le métabolisme, la croissance, la survie et la prolifération cellulaire (Ray, Huang, & Tsuji, 2012).

1.4.1.1 La régulation des PTPs par l'oxydation réversible

L'activation de RTKs comme l'EGFR et le PDGFR mène à la phosphorylation en chaîne de multiples kinases et ultimement, à l'activation de facteurs de transcription favorisant la prolifération cellulaire (Boutros et al., 2008). Ces voies de signalisation dépendent d'un équilibre entre les kinases et les phosphatases qui régulent l'état de phosphorylation de leurs substrats (Garrington & Johnson, 1999). De façon intéressante, la déphosphorylation catalysée par les PTPs s'amorce grâce à une cystéine localisée dans un motif HC(X)₅R conservé chez toutes les PTPs. Localisée dans le site actif, celle-ci possède un groupement thiolate (S⁻) qui lui confère un caractère nucléophile (Tonks, 2006), mais puisqu'elle possède un pKa entre 4 et 5 (i.e. beaucoup plus faible que dans le cas d'une cystéine normale dont le pKa se situe entre 8 et 9) (Peters, Frimurer, & Olsen, 1998), elle est très sensible aux ROS cellulaires (Ostman et al., 2011).

En effet, les ROS oxydent la cystéine catalytique des PTPs par la conversion de son groupement thiolate en acide sulfénique (SOH) de façon réversible, alors qu'une plus forte concentration de ROS entrainera la formation d'un acide sulfinique (SO₂H) ou sulfonique (SO₃H) de façon irréversible (**Figure 1.6**) (Ostman et al., 2011). Plus précisément, il a été montré que l'oxydation réversible de PTP1B induit la formation d'un acide sulfénique ensuite converti en un sulphénamide cyclique contenant un lien covalent entre la cystéine catalytique et le résidu sérine adjacent (Salmeen et al., 2003). Ce changement conformationnel empêche le site catalytique de la PTP d'interagir avec son substrat, tout en exposant la cystéine au

cytoplasme et la rendant disponible à de nouvelles interactions protéine-protéine (Tonks, 2006). Il est d'ailleurs présumé que c'est le changement de conformation induit par l'oxydation de la PTP lui permet d'interagir avec des agents réducteurs qui réduiront le sulphénamide cyclique en thiolate, activant à nouveau la PTP (Ostman et al., 2011). Par exemple, des agents réducteurs comme le glutathion ou la thiorédoxine ont été proposés comme étant des réducteurs importants de PTEN et PTP1B (Dagnell et al., 2013; Schwertassek et al., 2014).

L'oxydation réversible des PTPs par les ROS constitue un mode de régulation important puisqu'elle inactive l'enzyme de façon transitoire et déplace l'équilibre en faveur des PTKs, activant ainsi les voies de signalisation (Tonks, 2005). Cependant, bien que l'oxydation des PTPs soit à ce jour bien caractérisée, les mécanismes de réduction des PTPs sont très mal caractérisés.

Un bon exemple de régulation par les ROS survient suite à l'activation de l'EGFR et du PDGFR, puisque celle-ci induit l'activation des NOX2/4 membranaires et donc la formation de ROS (Heppner & van der Vliet, 2016). Ceux-ci oxydent et inactivent réversiblement PTP1B, une des PTPs responsables de déphosphoryler l'EGFR (sur les Tyr 992 et 1148) (Milarski et al., 1993) et le PDGFR, ayant pour effet d'augmenter la phosphorylation et l'activation des MAPKs (Bae et al., 1997).

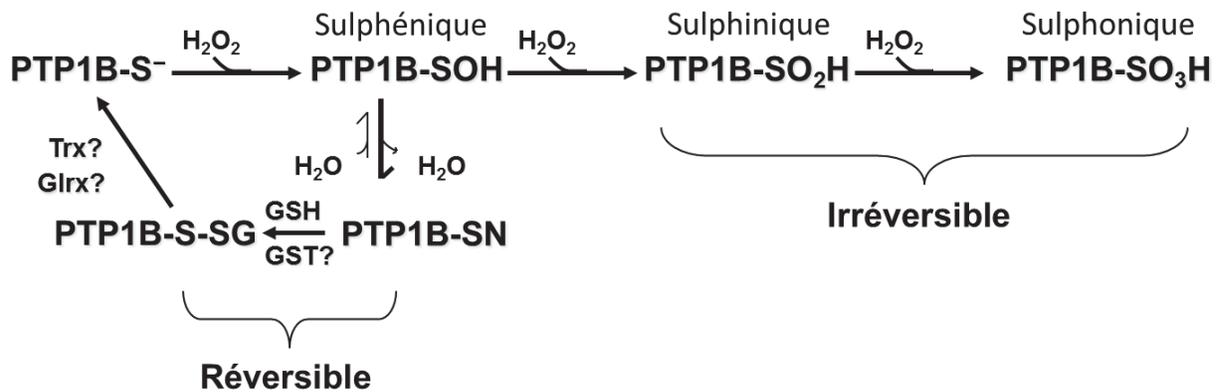


Figure 1.6. L'oxydation de PTP1B est réversible. Le groupement thiolate (S⁻) de la cystéine catalytique possède un faible pKa et est très sensible à l'oxydation. Ainsi, en présence de ROS comme le H₂O₂, elle est oxydée en acide sulfénique et PTP1B est inactivé de façon réversible, alors qu'une plus forte concentration de ROS entrainera la formation d'un acide sulfinique, puis d'un acide sulfonique de façon irréversible. L'oxydation réversible entraine la formation d'un sulphénamide cyclique (SN), un changement conformationnel qui serait important pour permettre l'interaction avec des agents réducteurs comme la thiorédoxine (Trx) ou la glutarédoxine (Glrx).

1.4.2 La régulation des phosphatases HAD par l'oxydation réversible

L'oxydation réversible par les ROS constitue une modification post-traductionnelle importante dans la régulation de l'activité de nombreuses protéines impliquées dans la signalisation intracellulaire (Ray et al., 2012). Bien que l'oxydation réversible des PTPs par les ROS soit bien caractérisée à ce jour et qu'elle constitue un mode de régulation important (Tonks, 2006), la sensibilité des phosphatases HAD à l'oxydation demeure très peu connue. Alors que les PTPs exercent leur activité grâce à une cystéine catalytique, les membres de la famille des phosphatases HAD catalysent la déphosphorylation via un résidu aspartate (Seifried et al., 2014). En collaboration avec une équipe allemande, nous avons récemment démontré que l'oxydation réversible des cystéines non-catalytiques de la phosphoglycolate phosphatase, une phosphatase HAD typique apparentée à la chronophine, inhibe son activité enzymatique *in vitro* et induit son oligomérisation (Seifried et al., 2016). Cette étude est la première démonstration que les phosphatases HAD, des enzymes importantes dans plusieurs pathologies humaines (Seifried et al., 2013), sont contrôlées par un mécanisme redox.

1.5 Objectifs

De nombreuses voies de signalisation intracellulaires dépendent d'un équilibre de phosphorylation de leurs substrats maintenu par l'activité des PTKs et des PTPs. De façon intéressante, l'oxydation réversible des PTPs par les ROS constitue un mode de régulation important de leur activité enzymatique qui modifie cet équilibre en faveur des PTKs et qui tend à activer les voies de transduction, pouvant induire un changement d'expression génique. La dérégulation des voies de signalisation intracellulaires a été montrée pour être la cause de plusieurs pathologies chez l'humain.

L'inactivation des PTPs par oxydation réversible de leur cystéine induit d'importants changements conformationnels caractérisés par une conversion d'un acide sulfénique en sulphénamide cyclique protégeant la phosphatase de l'oxydation irréversible. Bien que les mécanismes d'oxydation de PTP1B aient été bien caractérisés jusqu'à ce jour, les mécanismes de réduction restent mal compris. L'objectif de notre étude est de caractériser les mécanismes d'oxydoréduction de PTP1B dans la signalisation du récepteur à l'EGF.

Nous avons identifié 14-3-3 ζ comme étant un nouveau partenaire d'interaction de PTP1B oxydé suite à une stimulation à l'EGF. Puisque les protéines de la famille des 14-3-3 régulent de nombreux complexes protéiques et ont été montrées pour interagir avec des protéines du métabolisme réducteur, nous avons émis l'hypothèse que l'oxydation de PTP1B promeut une nouvelle interaction avec 14-3-3 ζ afin d'initier sa réactivation. Étant donné le rôle important des PTPs dans le développement de multiples pathologies humaines, une meilleure compréhension de leurs mécanismes d'oxydoréduction permettrait de déterminer de nouvelles cibles thérapeutiques.

Chapitre 2. Matériel et Méthodes

2.1 Préparation des ADNs plasmidiques

2.1.1 Transformation bactérienne

50 μ L de bactéries *E. coli* DH5 α ont été incubées 30 minutes sur glace en présence de 1 μ L d'une construction plasmidique codant pour les protéines Flag-PTP1B WT (pCMV-2B Flag-PTP1B WT), Flag-PTP1B CASA (pCMV-2B Flag PTP1B CASA) ou HA-14-3-3 ζ (pCNDA-3 HA-14-3-3 ζ). Les plasmides codant pour les protéines Flag-PTP1B et Flag-PTP1B CASA ont été obtenus du laboratoire de Dr. Nicholas K. Tonks (Cold Spring Harbor Laboratory), alors que le plasmide encodant pour et HA-14-3-3 ζ a été obtenu du laboratoire de Dr. Dihua Yu (University of Texas, MD Anderson Cancer Center). Les bactéries ont ensuite subi un choc thermique de 45 secondes à 37 °C, puis ont été incubées 2 minutes sur glace. 500 μ L de milieu S.O.C. (2% m/v tryptone, 0,5% m/v extrait de levure, 8,56 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 20 mM glucose, pH 7,0) ont été ajoutés au mélange avant une incubation de 1 heure à 37°C sous agitation à 300 rpm. Les bactéries ont ensuite été mises en culture pour une nuit à 37°C sur un pétri contenant du milieu DYT (1,6% tryptone, 1% extrait de levures, 0,5% m/v NaCl, 2 mM, 1,5% agar) en présence de l'antibiotique approprié (Kanamycine 50 μ g/ μ L pour PTP1B WT et CASA, Ampicilline 100 μ g/ μ L pour 14-3-3 ζ).

2.1.2 Isolation de l'ADN plasmidique

Suivant l'incubation des bactéries sur pétris, une colonie a été repiquée et incubée 5 heures sous agitation à 300 rpm à 37°C dans 2 mL de milieu DYT sans agar, en présence de l'antibiotique approprié, puis toute une nuit dans 100 mL. Une fois la transformation bactérienne complétée, les plasmides ont été isolés et purifiés par midi-prep en utilisant un kit de purification d'ADN (Macherey-Nagel) tel que décrit par le détaillant.

2.2 Culture cellulaire et transfection

Des cellules HEK293T (ATCC) ont été maintenues en culture en gardant une confluence de 40-90% dans du milieu EMEM (Eagle's Minimum Essential Medium, 1000 mg/L glucose, ATCC) contenant 100 unités/mL penicilline, 100 ug/mL streptomycine et 10% de sérum de veau fœtal (FBS, *Fœtal Bovine Serum*) à 5% CO₂ à 37°C. À 80% de confluence, les cellules ont été cotransfectées avec 4 µg de plasmides codant pour Flag-PTP1B WT (ou CASA) et HA-14-3-3ζ en utilisant un kit de transfection (TurboFect Transfection Reagent, ThermoFisher) et du milieu Opti-MEM (ThermoFisher) tel que recommandé par le détaillant. Le tout a été incubé 48 heures à 37°C. Avant chaque expérience, les cellules ont été déprimées en sérum 16 heures dans du milieu EMEM ne contenant aucun FBS.

2.3 Préparation des lysats cellulaires

2.3.1 Préparation de la boîte hypoxique

Toutes les expériences ont été effectuées à l'intérieur d'une boîte hypoxique (Coy Laboratory Products) contenant 100% argon (Praxair). Afin d'éviter l'oxydation spontanée des protéines par les tampons de lyse, ceux-ci ont tous été dégazés à 2,5 Torr sous vide pendant 1 heure, à l'aide d'une pompe à aspiration (Thermo Scientific), puis placés sur glace tel que décrit précédemment (Boivin et al., 2008).

2.3.2 Traitements préalables

Les cellules HEK293T cotransfectées ont préalablement été stimulées à l'EGF (100 ng/mL, Sigma-Aldrich) afin de provoquer la production ROS cellulaires, et ce, dans le cadre de plusieurs expériences. Préalablement à cette stimulation, les cellules ont été traitées avec différents réactifs. Le SS-31 (100 μ M) et la N-acétylcystéine (5 mM) ont été utilisés comme antioxydants, la triciribine (TCB) (5 μ M, 20 minutes, Millipore) a été utilisé pour inhiber la phosphorylation de PKB, alors que le R18 (25 μ M, 90 minutes, Sigma-Aldrich) agissait comme inhibiteur des 14-3-3. Les cellules ont également été traitées avec du peptide TAT (*transactivator of transcription*, 10 μ M, 1 heure, Genscript) seul (GRKKRRQRRRPQ) ou couplé au peptide KNRNRYRDV(S) non phosphorylé.

2.3.3 Lyse cellulaire et immunoprécipitations

Suite à l'un ou l'autre de ces traitements, les cellules ont été lysées sur glace avec du tampon de lyse (20 mM Hepes pH 7,4, 150 mM NaCl, 1% NP40, 1 mM EDTA, 10 mM NaF, 25 µg/mL aprotinine, 25 µg/mL leupeptine, 1 µM microcystine, 100 nM acide okadaïque). 1 mM Na₃VO₄ a également été ajouté dans le cadre des expériences étudiant la phosphorylation de l'EGFR. Les cellules ont été lysées 30 minutes à 4°C, puis centrifugées 6 minutes à 10 000 rpm. Les lysats ont été dosés à 595 nm par la méthode de Bradford (Bradford, 1976). 500 µg de protéines ont été mis en présence de 700 µL de tampon de lyse et de 10 µL de billes couplées à un anticorps anti-Flag (Sigma-Aldrich), liant Flag-PTP1B WT/CASA, anti-HA (Roche), liant HA-14-3-3ζ, ou anti-phosphotyrosine (clone 4G10, Millipore), liant les protéines phosphorylées en tyrosine, pour 3 heures sous rotation à 4°C. Les billes ont été lavées 3 fois dans du tampon de lyse, puis resuspendues dans du tampon de chargement Laemmli (187,5 mM Tris-HCl, pH 6,8, 6% m/v SDS, 30% glycérol, 0,03% bleu de bromophénol, 15% β-mercaptoéthanol).

2.4 Cysteinyl-labeling assay

2.4.1 Lyse cellulaire

Afin d'observer l'oxydation de PTP1B, un cysteinyl-labeling assay (CLA) a été effectué (Boivin, Yang, & Tonks, 2010). D'abord, des cellules HEK293T préalablement cotransfectées pour exprimer Flag-PTP1B et HA-14-3-3ζ ont été amenées à confluence, puis déprimées en sérum pour 16 heures. Elles ont été stimulées avec 100 ng/mL EGF afin d'induire la production de ROS ainsi que l'oxydation des PTPs cellulaires, puis lysées dans un tampon de lyse (25 mM acétate de sodium, pH 5,5, 150 mM NaCl, 10% glycérol, 1% NP40, 10 µg/mL aprotinine, 10 µg/mL leupeptine, 125 unités/mL SOD, 250 unités/mL catalase) préalablement dégazé. Juste

avant la lyse, 10 mM d'acide iodoacétique (IAA, ThermoFisher) a été ajouté afin d'alkyler les groupements thiol (SH) des PTPs réduites. La lyse a duré 1 heure sous agitation à température pièce afin de permettre une bonne alkylation. Les lysats cellulaires ont été centrifugés 10 minutes à 14 000 rpm à 4°C. La concentration en protéines a été déterminée à 595 nm par la méthode de Bradford.

2.4.2 Biotinylation des PTPs oxydées

Pendant ce temps, des colonnes de dessalage (ThermoFisher) ont été centrifugées 2 minutes à 1000g afin de retirer la solution de stockage, puis équilibrées avec 3 mL de tampon de lyse. Pour chaque condition, un volume de lysats cellulaires contenant 5 mg de protéines a été transféré dans le centre des colonnes afin d'enlever l'IAA par gravité. Les échantillons ont ensuite été élués par centrifugation des colonnes 2 minutes à 1000g, puis transférés dans des microtubes ambre afin de garder les échantillons à l'abri de la lumière. Les PTPs oxydées ont été réduites avec l'ajout de 1 mM tris(2-carboxyethyl)phosphine (TCEP) (ThermoFisher), un agent réducteur, pour 30 minutes sous agitation à température pièce. Elles ont finalement été marquées avec une sonde biotylée, l'iodoacétyle-(polyéthylène glycol)2-biotine (IAP) (ThermoFisher) à 5 mM pour 1 heure, sous agitation à température pièce.

2.4.3 Immunoprécipitation des PTPs oxydées

Des billes de sépharose couplées à la streptavidine (GE Healthcare Life Sciences) ont été centrifugées 2 minutes à 3000 rpm à 4°C et lavées 3 fois avec du tampon de lyse. 25 µL de billes concentrées à 50% ont été incubés avec le total des échantillons biotylés pour 16 heures sous rotations à 4°C. Les billes ont été centrifugées 2 minutes à 3000 rpm à 4°C, lavées 3 fois avec du tampon de lyse, puis resuspendues dans 15 µL de tampon de chargement Laemmli.

2.5 Immunoblots

Les échantillons immunoprécipités ainsi que les lysats protéiques conservés dans le tampon Laemmli ont été chauffés 1 minute à 100°C afin de dénaturer les protéines, puis centrifugés 1 min 30 secondes à 10 000 rpm. Ils ont ensuite été chargés sur un gel SDS-PAGE constitué d'un gel de concentration à 5% d'acrylamide et d'un gel de séparation à 10% d'acrylamide. Les échantillons ont migré 5 heures à 25 mA en présence de tampon de migration (0,02 M Tris-HCl, pH 8,3). Une échelle de poids moléculaire (Precision Plus Protein Dual Color Standards, BIO-RAD) a été utilisée. Les échantillons protéiques ont été transférés sur une membrane de nitrocellulose (BIO-RAD) avec des pores de 0,2 µm de taille pendant 1h30 à 100 V en présence de tampon de transfert (Tris-Base 25 mM, glycine 192 mM, 5% méthanol). La membrane a été bloquée dans une solution de TBST (25 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0,05% Tween 20, pH 7,5) contenant 5% lait pour 30 minutes sous agitation, puis mise en présence d'anticorps primaire et secondaire appropriés (**Tableau 2.1**). La membrane a été lavée 3 fois 10 minutes avec du TBST entre chaque étape. Les bandes ont été révélées par chimioluminescence en utilisant un substrat ECL (*enhanced chemiluminescence*, PerkinElmer) tel que décrit par le détaillant.

Anticorps	Hôte	Format	Compagnie	Numéro de catalogue	Dilution
Flag M2- peroxydase	Souris	Monoclonal	Sigma-Aldrich	F3165	1/500 000
HA-peroxydase (3F10)	Rat	Monoclonal	Roche	11058700	1/2000
β -actine	Souris	Monoclonal	Abcam	ab49900	1/50 000
EGFR	Lapin	Polyclonal	Santa Cruz Biotechnology	sc-03-G	1/1000
pan-Akt (C67E7)	Souris	Monoclonal	Cell Signaling Technology	4691	1/1000
Phospho-Akt (S473)	Lapin	Polyclonal	Invitrogen	348400	1/1000
14-3-3 ζ	Lapin	Polyclonal	Santa Cruz Biotechnology	sc-1019	1/1000
Streptavidine- HRP	-	-	GE Healthcare	GERPN1231	1/10 000
Phospho- PTP1B (S50)	Lapin	Polyclonal	Abcam	ab88472	1/1000
GAPDH	Souris	Monoclonal	ThermoFisher	AM4300	1/10 000
Anti-souris HRP	Chèvre	-	Jackson ImmunoResearch	115-035-174	1/10 000
Anti-lapin HRP	Chèvre	-	Jackson ImmunoResearch	115-035-003	1/10 000

Tableau 2.1. Anticorps utilisés lors des immunoblots de type Western

2.6 Couplage de billes d'iodoacétyle et repêchage de 14-3-3ζ

200 µL de billes UltraLink Iodoacetyl Gel (Pierce biotechnology) ont été lavées 3 fois avec 1 mL de tampon de liaison (50 mM Tris-base, 5 mM EDTA-Na, pH 8,5) en centrifugeant 1 minute à 3000 rpm à chaque fois. 1 mg de peptide CKNRNRYRDVS ou CKNRNRYRDVpS (Alpha Diagnostic) synthétisé a été resuspendu dans 2 mL de tampon de liaison contenant 25 mM TCEP, puis incubé avec les billes 30 minutes à 1000 rpm, et 30 minutes sans agitation. Le sulfure du peptide permet sa liaison au groupement iodoacétyle des billes. Le tout a été centrifugé 2 minutes à 3000 rpm, et les billes ont été lavées 3 fois avec du tampon de liaison. 200 µL de L-cystéine ont été ajoutés aux billes, bloquant leurs sites non spécifiques, 30 minutes à 1000 rpm et 30 minutes sans agitation. Le tout a été centrifugé 2 minutes à 3000 rpm et les billes ont été lavées 3 fois avec du tampon de liaison, une fois avec 1 M NaCl et une fois avec du PBS 0,05% NaN₃. Les billes ont été conservées à 4°C.

Une fois les billes pré-couplées, 15 pétris de cellules HEK293T confluentes ont été lysés avec 500 µL de tampon de lyse (25 mM Hepes, 150 mM NaCl, 0,25% acide désoxycholéique, 10% glycérol, 25 mM NaF, 10 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, 1 mM Na₃VO₄, 1% triton X-100, 25 µg/mL leupeptine, 25 µg/mL aprotinine, 0,5 mM PMSF), puis centrifugés 5 minutes à 10 000 rpm à 4°C. Un échantillon de lysat a été gardé à titre de contrôle pour immunoblot. Les billes pré-couplées ont été lavées une fois au tampon de lyse, puis incubées avec les lysats 2 heures à 4°C. Elles ont été centrifugées 3 minutes à 1000 rpm à 4°C, et le surnageant a été conservé comme contrôle. Les billes ont été lavées 3 fois au tampon de lyse et 5 mg de peptide ont été ajoutés aux billes 1 heure afin d'éluer le complexe protéique. Le tout a été centrifugé, le surnageant contenant le complexe et les billes ont été conservées. Tous les échantillons ont été chargés sur SDS-PAGE afin d'effectuer un immunoblot contre 14-3-3ζ.

Chapitre 3. Résultats

3.1 L'oxydation de PTP1B promeut de nouvelles interactions protéines-protéines

Des données de la littérature ont montré que l'oxydation réversible de PTP1B induit d'importants changements conformationnels de son site actif caractérisés par la formation d'un acide sulfénique, rapidement converti en sulphénamide cyclique (Salmeen et al., 2003). Afin de caractériser comment ces changements de conformation influencent la capacité de l'enzyme à effectuer de nouvelles interactions protéine-protéine, notre collaborateur Dr. Seung Jun Kim (Korea Research Institute of Bioscience & Biotechnology) a effectué une modélisation tridimensionnelle de ses structures réduite et oxydée (**Fig. 3.1A**). Celle-ci montre un changement conformationnel important de la boucle phosphotyrosine du site actif de PTP1B qui devient nouvellement exposée au cytosol dans sa structure oxydée, alors qu'elle est complètement enfouie sous son site catalytique dans sa structure réduite. Ces données suggèrent que la boucle nouvellement exposée au cytosol pourrait participer à des nouvelles interactions protéine-protéine.

À partir de cette modélisation, Dr. Kim a calculé le changement conformationnel (i.e. mesuré en Å) de la séquence située entre la lysine 41 et la sérine 50 (K⁴¹NRNRYRDVS⁵⁰) de la boucle phosphotyrosine de de PTP1B après son oxydation in vitro (**Fig. 3.1B**). Ces données montrent un changement de conformation notable de la tyrosine 46, un résidu important dans la spécificité de PTP1B (Tonks, 2003), ainsi qu'un changement moins prononcé des acides aminés adjacents. Ainsi, Dr. Boivin a ensuite effectué des pull-downs des différentes protéines pouvant

interagir avec la forme oxydée de PTP1B. Pour ce faire, le peptide K41-S50 a été synthétisé et une cystéine a été ajoutée en position n-1 afin de faciliter son couplage à des billes possédant un groupement iodoacétyle. Ensuite, des lysats de cellules HEK293T ont été utilisés pour le pull-down. Suite à ce pull-down, 14-3-3ζ a été identifié par nos collaborateurs (Dr. Darryl Pappin, Cold Spring Harbor Laboratory) comme étant un potentiel partenaire d'interaction de PTP1B oxydé (**Résultats préliminaires non inclus, Fig. 3.1C**).

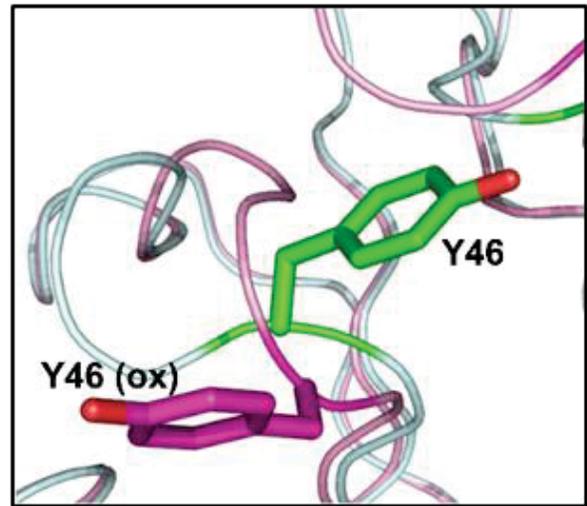
A

PTP1B (1-321)



PTP1B (réduit)
PTP1B-OX

Boucle p-Tyr



PTP1B (réduit)
PTP1B-OX

B

A.A.	PTP1B réduit (Å)	PTP1B oxydé (Å)
Lys 41	132.2	143.8
Asn 42	83.0	95.3
Arg 43	18.6	24.5
Asn 44	8.3	20.9
Arg 45	20.9	31.6
Tyr 46	76.6	167.7
Arg 47	166.9	155.4
Asp 48	71.1	12.0
Val 49	6.0	21.0
Ser 50	4.1	13.4

C

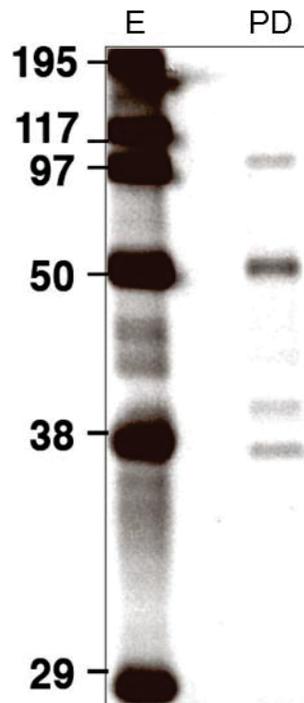


Figure 3.1. L'oxydation de PTP1B induit d'importants changements conformationnels.

(A) Une modélisation tridimensionnelle de PTP1B montre la boucle phosphotyrosine nouvellement exposée au cytosol suite à son oxydation (PTP1B-OX), alors qu'elle est normalement enfouie dans son site catalytique dans sa forme réduite. D'après notre collaborateur Dr. Seung Jun Kim (Korea Research Institute of Bioscience & Biotechnology). (B) Les changements de conformations de PTP1B oxydé ont été mesurés pour le peptide K⁴¹NRNRYRDVS⁵⁰ de la boucle phosphotyrosine nouvellement exposée au cytosol. (C) Ce peptide a été synthétisé, puis couplé à des billes d'iodoacétyle afin d'effectuer un pull-down (PD), et 14-3-3 ζ a été identifiée par spectrométrie de masse par Dr. Darryl Pappin (Cold Spring Harbor Laboratory) comme partenaire d'interaction du peptide de la boucle phosphotyrosine. E, échelle de poids moléculaire.

3.2 Caractérisation de l'oxydation réversible de PTP1B

Il est bien connu que l'EGF induit la production de ROS in vitro via l'activation de NOX2/4 (Oh et al., 2010). Afin de caractériser l'oxydation réversible de PTP1B suite à une stimulation à l'EGF de cellules HEK293T, nous avons effectué un cysteinyl-labeling assay (CLA) tel que décrit précédemment (Boivin et al., 2010). Brièvement, cette technique permet de cibler les PTPs réversiblement oxydées in vitro en les marquant avec une sonde biotinylée et en les purifiant à l'aide de billes couplées à la streptavidine (**Fig. 3.2**). Les PTPs réversiblement oxydées sont ensuite détectées par immunoblot de type Western. Nos résultats indiquent qu'une stimulation à 100 ng/mL d'EGF induit l'oxydation réversible de PTP1B dans les deux premières minutes de stimulation, puis la PTP est ensuite réduite et réactivée dans les minutes qui suivent. Ces données indiquent que l'oxydation de PTP1B suite à une stimulation à l'EGF est réversible.

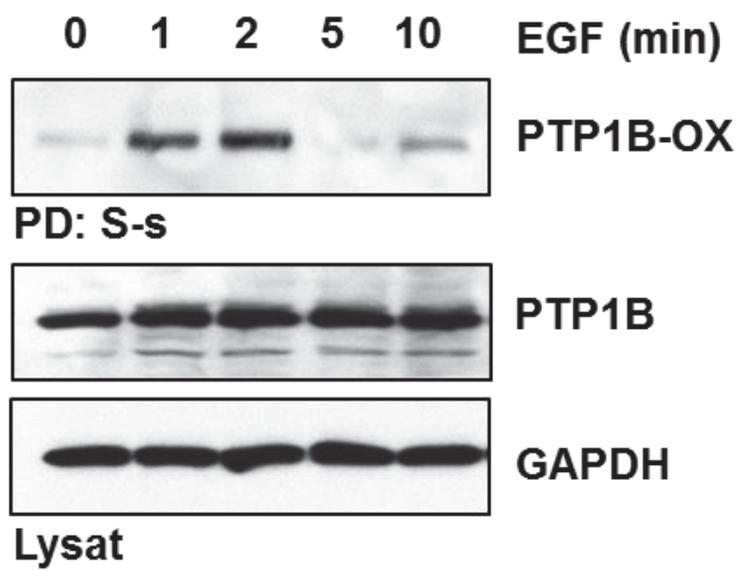


Figure 3.2. L'activation du récepteur à l'EGF induit l'oxydation réversible de PTP1B dans les cellules humaines en culture. Des cellules HEK293T ont été stimulées à l'EGF, puis l'oxydation de PTP1B (PTP1B-OX) a été mesurée en marquant les PTPs réversiblement oxydée avec une sonde biotinyllée, puis en les purifiant par pull-down (PD) en utilisant des billes de sépharose couplées à la streptavidine (S-s). L'oxydation réversible de PTP1B était maximale à 2 minutes de stimulation, puis l'enzyme a été réactivée dans les minutes suivantes, indiquant que l'oxydation de la phosphatase est réversible.

3.3 Caractérisation de l'interaction entre 14-3-3 ζ et PTP1B oxydé

3.3.1 La forme oxydée de PTP1B interagit avec 14-3-3 ζ

L'identification de la protéine 14-3-3 ζ par spectrométrie de masse suggère qu'elle constitue un potentiel partenaire d'interaction de la forme oxydée de PTP1B. Afin d'observer et de caractériser cette interaction, nous avons mis des cellules HEK293T en culture et nous les avons transfectées avec des plasmides codant pour Flag-PTP1B et HA-14-3-3 ζ . Les cellules ont par la suite été stimulées à l'EGF, puis lysées. Des immunoprécipitations des PTP1B et de 14-3-3 ζ ont été effectuées à partir des lysats cellulaires de HEK293T, puis les échantillons ont été séparés par SDS-PAGE et transférés sur une membrane de nitrocellulose.

Nos résultats d'immunoblot montrent que, suite à une stimulation à l'EGF, l'immunoprécipitation (IP) de PTP1B après stimulation à l'EGF attire avec elle 14-3-3 ζ , confirmant une interaction entre les deux protéines (**Fig. 3.3**). Cette interaction était également observée lorsque nous avons effectué l'expérience réciproque, c'est-à-dire lorsque nous avons immunoprécipité 14-3-3 ζ . Dans le deux cas, l'interaction n'a pas été observée en absence de stimulation à l'EGF. Alors que l'interaction était maximale à 2 minutes de stimulation elle a graduellement diminué jusqu'à 10 minutes. Puisque l'oxydation de PTP1B survient également dans les 2 premières minutes de stimulation, ces résultats suggèrent que l'oxydation de PTP1B promeut une nouvelle interaction avec 14-3-3 ζ .

Afin de vérifier si 14-3-3 ζ interagit avec la forme oxydée de PTP1B, nous avons étudié l'interaction entre 14-3-3 ζ et le mutant CASA de PTP1B (PTP1B CASA), un mutant dans lequel la cystéine 215 et la sérine 216 du site catalytique de PTP1B sont mutés en alanine, mimant sa

forme oxydée (Haque et al., 2011). Lorsqu'exprimées dans des cellules HEK293T, les deux protéines interagissaient ensemble (**Fig. 3.3**), suggérant que 14-3-3 ζ est un partenaire de la forme oxydée de PTP1B. Connaissant le rôle des protéines 14-3-3 dans la régulation de multiples complexes protéiques et sachant qu'elles interagissent avec de multiples protéines réductrices comme la thiorédoxine 1 et la glutathion-S-transférase (Mackintosh, 2004), ces résultats suggèrent que le recrutement de 14-3-3 ζ pourrait jouer un rôle dans la réactivation de PTP1B.

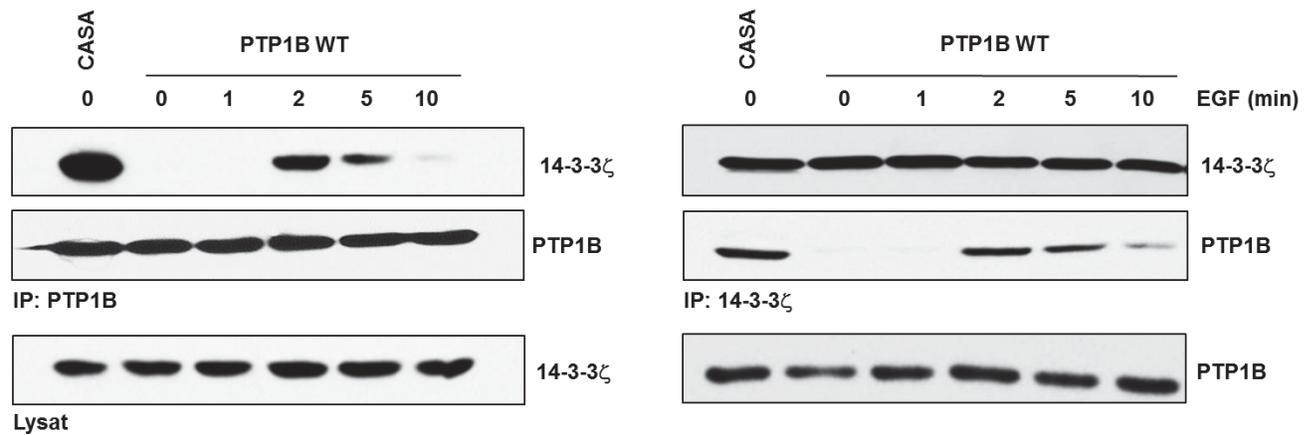


Figure 3.3. L'oxydation de PTP1B induit une nouvelle interaction avec 14-3-3 ζ . Des cellules HEK293T ont été cotransfectées pour exprimer PTP1B WT ou CASA et 14-3-3 ζ , et stimulées à l'EGF. Les cellules ont été lysées, et suite à une co-immunoprécipitation (IP) de PTP1B et 14-3-3 ζ , nos résultats indiquent une interaction entre les 2 protéines qui augmente dans les 2 premières minutes de stimulation à l'EGF, suivant le patron d'oxydation de PTP1B. Le mutant CASA, mimant la forme oxydée de PTP1B, montrait une forte interaction avec 14-3-3 ζ , suggérant d'autant plus que l'oxydation de PTP1B est essentielle à l'interaction.

3.3.2 L'interaction entre PTP1B oxydé et 14-3-3ζ est modifiée par les antioxydants

Nos résultats de co-immunoprécipitation indiquent que l'oxydation réversible de PTP1B promeut une nouvelle interaction avec 14-3-3ζ. Afin de vérifier que cette interaction est dépendante de la production de ROS à l'intérieur de la cellule, nous avons tenté de la caractériser en présence de deux antioxydants connus, soit la N-acétylcystéine (NAC), un antioxydant non spécifique produisant du glutathion à l'intérieur du cytosol (De Flora et al., 2001), ainsi que le SS-31, un antioxydant ayant pour cible la membrane interne de la mitochondrie (Birk et al., 2013). Alors que le NAC a bloqué avec succès l'interaction entre PTP1B WT et 14-3-3ζ induite par une stimulation de 2 minutes à l'EGF, le SS-31 n'a eu aucun effet (**Fig. 3.4A**). Puisque le mutant CASA de PTP1B mime sa forme oxydée, ni une stimulation à l'EGF ou la présence d'antioxydant n'ont eu d'effet sur son interaction avec 14-3-3ζ. Tel qu'attendu, le NAC a complètement bloqué l'interaction entre les deux protéines lors d'une cinétique complète de stimulation à l'EGF (**Fig. 3.4B**). Puisque le NAC est le seul antioxydant ayant eu un effet, ces résultats suggèrent que l'interaction entre PTP1B et 14-3-3ζ est directement dépendante de la production de ROS cytosoliques, mais pas des ROS mitochondriaux.

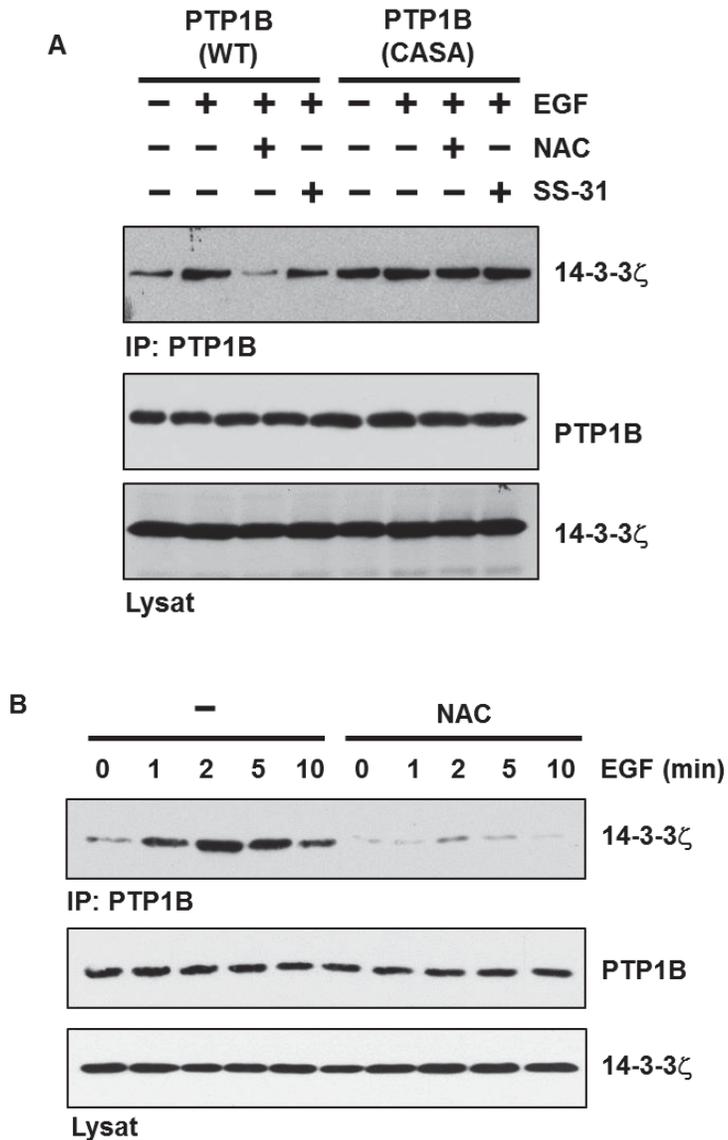


Figure 3.4. L'interaction entre PTP1B et 14-3-3 ζ dépend de la production de ROS cytosoliques. (A) Une IP de PTP1B WT ou CASA a été effectuée à partir de lysats de cellules HEK293T stimulées à l'EGF, en présence ou non des agents antioxydants NAC ou SS-31. L'interaction avec 14-3-3 ζ a été caractérisée par immunoblot. (B) L'interaction a ensuite été caractérisée lors d'une cinétique complète de stimulation à l'EGF, en présence et en absence de NAC. Alors que le NAC a bloqué avec succès l'interaction entre les deux protéines, le SS-31 n'a présenté aucun effet.

3.3.3 Le R18 bloque l'interaction entre PTP1B et 14-3-3ζ

Les 14-3-3 sont des protéines qui agissent avec leurs cibles phosphorylées sous forme de dimères (Yaffe, 2002). De façon intéressante, le R18 (PHCVPRDLSWLDLEANMCLP), est un peptide non phosphorylé qui permet d'inhiber l'action de chaque isoforme des 14-3-3 de façon compétitive en s'attachant à un des deux sites d'interaction avec une plus forte affinité ($K_d = 80 \text{ nm}$) que leurs partenaires phosphorylés (Mackintosh, 2004). Nous avons tenté de caractériser l'interaction entre PTP1B et 14-3-3ζ en présence de R18. Nos données montrent que le R18 bloque avec succès l'interaction entre PTP1B et 14-3-3ζ (**Fig. 3.5A**).

Afin de vérifier comment le recrutement de 14-3-3ζ affecte l'oxydation de PTP1B, nous avons caractérisé l'oxydation de PTP1B par CLA en présence de R18. Nos données montrent que le R18 empêchait l'oxydation de PTP1B suite à une stimulation à l'EGF (**Fig. 3.5B**). Considérant que 14-3-3ζ est recrutée suite à l'oxydation de PTP1B, et que PTP1B est réduit en absence de 14-3-3ζ, ces résultats suggèrent que, lorsque recrutée, la protéine 14-3-3ζ protège PTP1B oxydé des agents réducteurs cytosoliques.

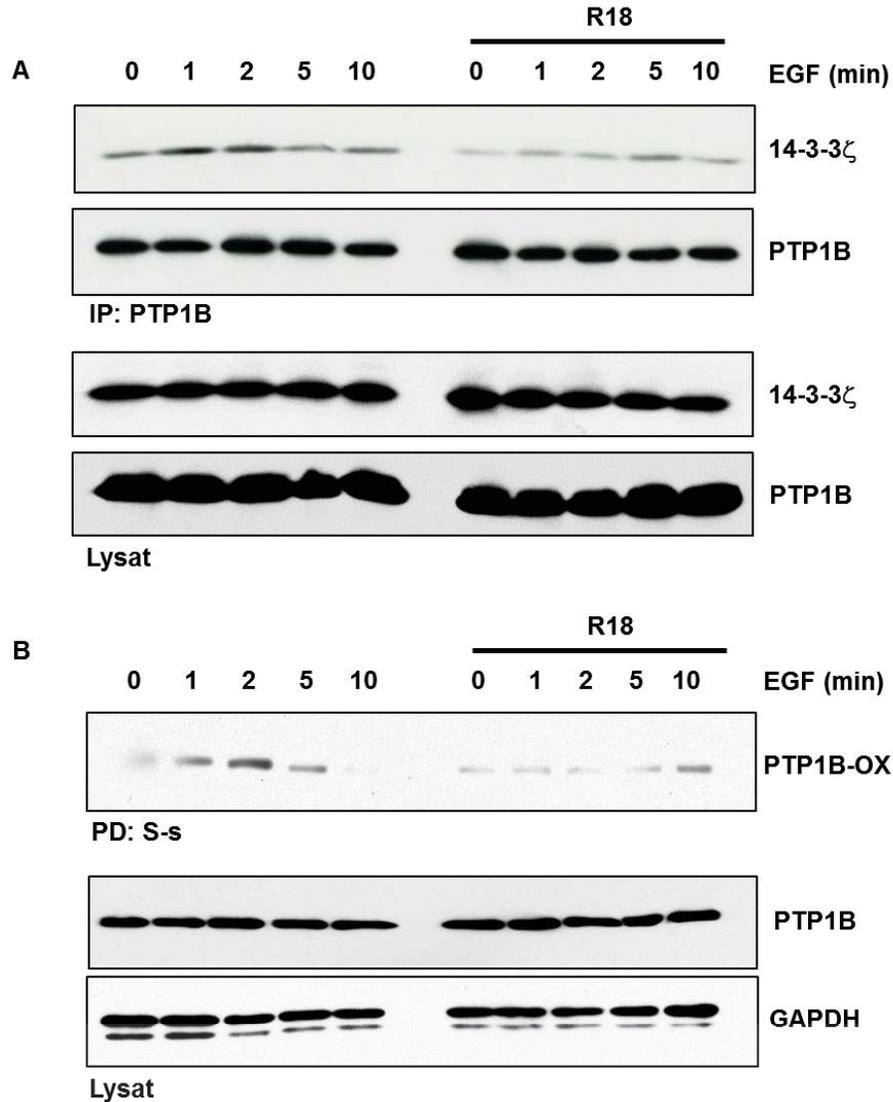


Figure 3.5. Le R18 bloque l'interaction entre PTP1B oxydé et 14-3-3ζ. (A) Une IP de PTP1B a été effectuée à partir de lysats de cellules HEK293T stimulées à l'EGF, en présence ou non d'un inhibiteur des 14-3-3, le R18. En présence de R18, l'interaction entre PTP1B et 14-3-3ζ était bloquée. (B) L'oxydation de PTP1B a été caractérisée par CLA en présence de R18. Ces données montrent que le R18 empêchait le recrutement de 14-3-3ζ ainsi que l'oxydation de PTP1B suite à une stimulation à l'EGF, suggérant que le recrutement de 14-3-3ζ protège PTP1B des agents réducteurs de la cellule.

3.3.4 Le rôle de la sérine 50 dans l'interaction entre PTP1B et 14-3-3ζ

Les protéines de la famille des 14-3-3 ont pour cible des protéines phosphorylées contenant le plus souvent un motif de reconnaissance RSXpSXP ou RXXXpSXP (Wilker & Yaffe, 2004). De façon intéressante, il a été montré que PTP1B est phosphorylé par PKB sur sa sérine 50 *in vivo* (Ravichandran et al., 2001) et que ce résidu fait partie du motif RYRDVS⁵⁰P semblable au motif de reconnaissance des 14-3-3. Puisque ce motif fait également partie du motif K⁴¹NRNRYRDVS⁵⁰ nouvellement exposé lors de l'oxydation de PTP1B, nous avons voulu vérifier comment la phosphorylation de la sérine 50 de PTP1B affectait sa capacité à interagir avec 14-3-3ζ. Pour ce faire, nous avons utilisé un anticorps reconnaissant spécifiquement la sérine 50 phosphorylée de PTP1B.

D'une part, nos résultats montrent une augmentation de la phosphorylation de la sérine 50 de PTP1B dans les deux premières minutes de stimulation à l'EGF, puis le résidu est déphosphorylé entre 2 et 10 minutes (**Fig. 3.6A**). Tel qu'attendu, ces résultats indiquent que la phosphorylation de PTP1B sur sa sérine 50 corrèlent avec l'interaction observée entre PTP1B et 14-3-3ζ.

Afin de vérifier que PKB était bien la kinase qui phosphoryle PTP1B sur ce résidu comme le suggèrent des données de la littérature, nous avons répété l'expérience en présence de Triciribine (TCB), un inhibiteur de la phosphorylation de PKB sur la sérine 473 ainsi que la thréonine 308 et qui empêche donc son activation (L. Yang et al., 2004). En présence de TCB, la phosphorylation de PTP1B sur la sérine 50 était altérée. Ceci avait aussi comme effet de réduire l'interaction observée entre PTP1B et 14-3-3ζ, tel qu'observé dans le cas du R18, suggérant que la phosphorylation de PTP1B sur la sérine 50 favorise l'interaction entre les deux

protéines. Par ailleurs, nous avons confirmé l'efficacité de l'inhibition de PKB puisque la phosphorylation de la sérine 473 était bloquée suite à l'action de la TCB.

Par la suite, afin de caractériser comment la TCB affecte l'état d'oxydation de PTP1B, un CLA a été effectué en présence de cet inhibiteur (**Fig. 3.6B**). En présence de TCB, PTP1B n'était pas réversiblement oxydé suite à une stimulation à l'EGF. En accord avec les résultats obtenus avec le R18, ces résultats suggèrent que 14-3-3 ζ est recrutée et stabilise la forme oxydée de PTP1B.

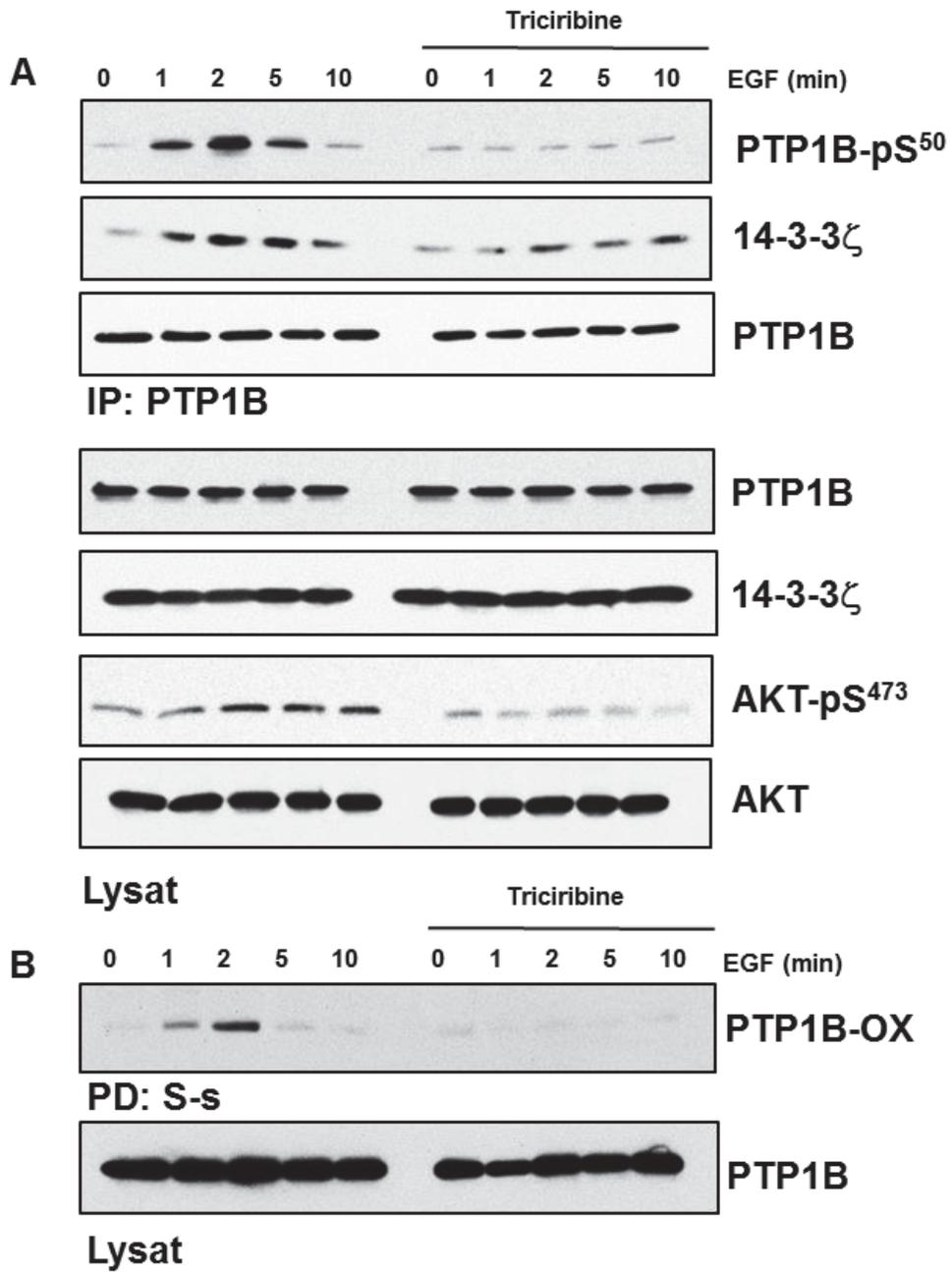
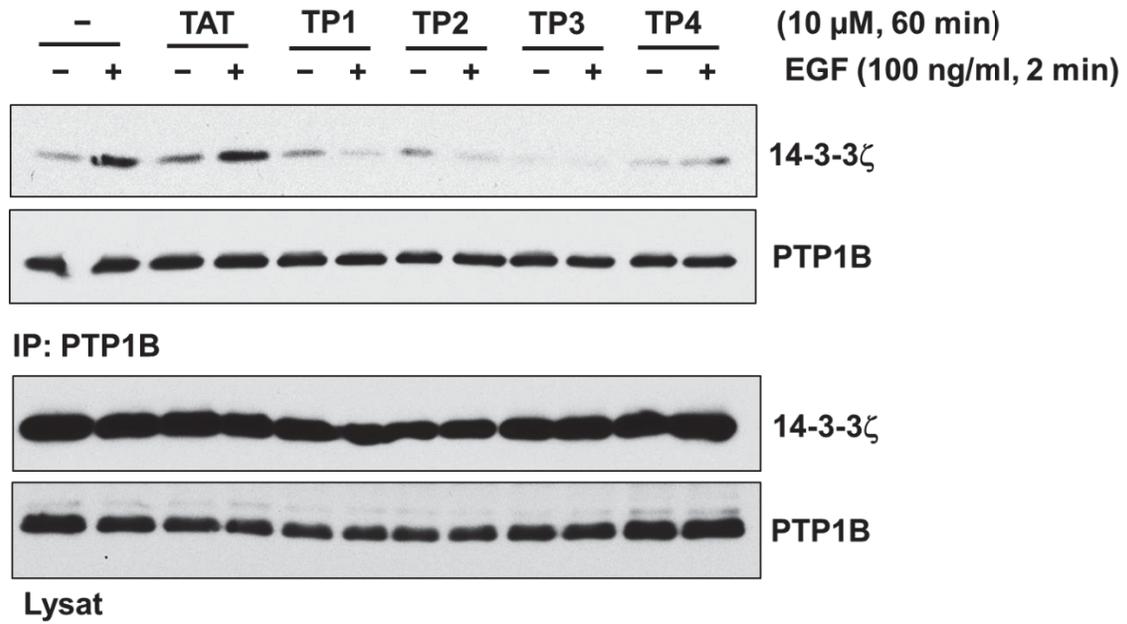


Figure 3.6. La triciribine bloque l'interaction entre PTP1B et 14-3-3 ζ . (A) Une IP de PTP1B a été effectuée à partir de lysats de cellules HEK293T stimulées à l'EGF, en présence ou non d'un inhibiteur de PKB, la TCB. Des immunoblots montrent qu'en présence de TCB, la phosphorylation de PTP1B sur la sérine 50 (PTP1B-pS⁵⁰) était altérée, et l'interaction entre les deux protéines était bloquée. (B) L'inhibiteur de PKB empêchait le recrutement de 14-3-3 ζ ainsi que l'oxydation de PTP1B suite à une stimulation à l'EGF, suggérant que 14-3-3 ζ protège PTP1B de la réduction.

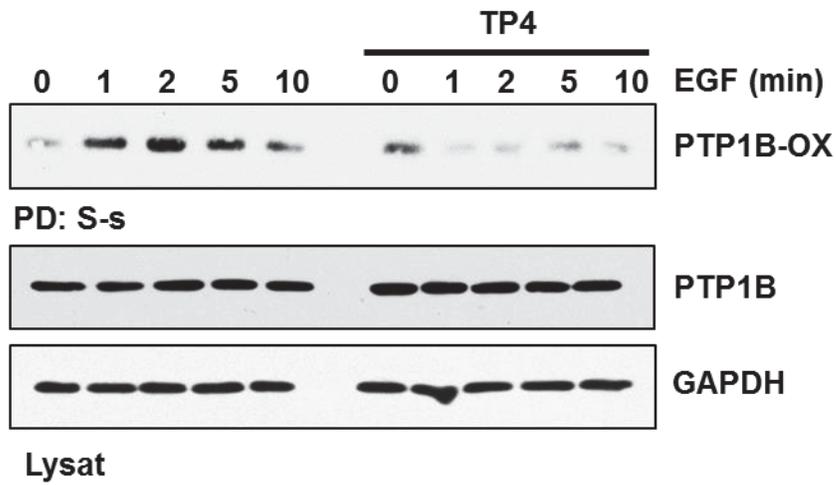
3.3.5 Des peptides dérivés de la boucle phosphotyrosine de PTP1B bloquent son interaction avec 14-3-3 ζ

Nos données suggèrent que le peptide K⁴¹NRNRYRDVS⁵⁰ nouvellement exposé au cytosol suite à l'oxydation de PTP1B interagit avec 14-3-3 ζ . Afin de vérifier cette affirmation, nous avons tenté d'inhiber de façon compétitive l'interaction de ce peptide avec 14-3-3 ζ en le synthétisant et en le couplant avec un peptide TAT (GRKKRRQRRRPQ). En effet, il s'agit d'un petit peptide facilitant l'entrée de diverses molécules à l'intérieur des cellules puisqu'il traverse facilement les membranes plasmiques (Frankel & Pabo, 1988). Nous avons donc synthétisé (Genscript) un total de 4 peptides (TP1-4) composé de la séquence d'acides aminés nouvellement exposée de PTP1B, avec et sans la sérine 50, couplée au peptide TAT en n-terminal ou en c-terminal, afin de leur permettre d'entrer à l'intérieur des cellules. Les 4 peptides synthétisés prévenaient avec succès l'interaction entre PTP1B et 14-3-3 ζ in vitro suite à une stimulation à l'EGF (**Fig. 3.7A**). Par la suite, un CLA montre qu'en présence du TP4, l'interaction entre les deux protéines était bloquée et que la réactivation de PTP1B était favorisée, suggérant que 14-3-3 ζ protège PTP1B de la réduction et stabilise sa forme oxydée.

A



B



Séquence TAT
Séquence du peptide

TP1: **KNRNRYRDV**SGRKKRRQRRRPQ
 TP2: **KNRNRYRDV**GRKKRRQRRRPQ
 TP3: GRKKRRQRRRPQ**KNRNRYRDV**
 TP4: GRKKRRQRRRPQ**KNRNRYRDVS**

Figure 3.7. L'interaction entre PTP1B et 14-3-3 ζ est bloquée par 4 peptides couplés au peptide TAT. (A) Une IP de PTP1B a été effectuée à partir de lysats de cellules HEK293T stimulées 2 minutes à l'EGF ou non-stimulées, en présence ou non des peptides (TP1-4) dérivés de la boucle phosphotyrosine de PTP1B. Ceux-ci sont constitués du peptide K⁴¹NRNRYRDVS⁵⁰ ou K⁴¹NRNRYRDV couplés au peptide TAT(GRKKRRQRRRPQ) en n-terminal ou en c-terminal. Les 4 peptides bloquaient avec succès l'interaction entre les 2 protéines. (B) Un CLA montre qu'en présence du TP4, l'oxydation réversible de PTP1B n'est pas induite par une stimulation à l'EGF, suggérant que 14-3-3 ζ protège PTP1B de la réduction.

Nos résultats suggèrent que, suite à une stimulation à l'EGF, PTP1B est rapidement réactivé en présence du TP4. Puisque l'EGFR constitue une protéine cible de PTP1B, nous avons tenté de vérifier si l'activité de la phosphatase est rapidement récupérée en présence du TP4 (**Fig. 3.8**). Pour ce faire, nous avons effectué une immunoprécipitation de toutes les protéines phosphorylées en tyrosine (p-tyr) à partir de billes couplées à un anticorps anti-phosphotyrosine (Clone 4G10). Nos résultats montrent que l'EGFR est phosphorylé dans les premières minutes de stimulation à l'EGF, puis graduellement déphosphorylé et inactivé entre 5 et 30 minutes de stimulation. Nous observons une diminution faible mais significative de la phosphorylation du récepteur à 2, 5 et 10 minutes de stimulation suite à un traitement du TP4. Ces données indiquent que PTP1B pourrait déphosphoryler certains sites de l'EGFR plus rapidement en présence du TP4. Alors que l'EGFR est phosphorylé sur 7 tyrosines différentes (Tyr 845, Tyr 992, Tyr 1045, Tyr 1068, Tyr 1086, Tyr 1148, Tyr 1173), PTP1B ne semble reconnaître que les tyrosines 992 (Z. Y. Zhang et al., 1996) et 1148 (Milarski et al., 1993). Il serait donc intéressant de vérifier la phosphorylation de l'EGFR sur ces résidus en présence du TP4.

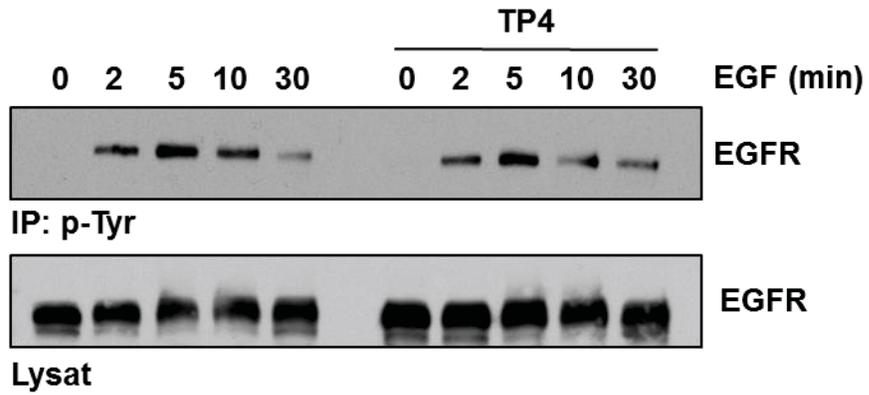


Figure 3.8. La phosphorylation de l'EGFR. Une immunoprécipitation (IP) des protéines phosphorylées en tyrosine a été effectuée à l'aide de billes couplées à un anticorps anti-phosphotyrosine (Clone 4G10) à partir de lysats de cellules HEK293T stimulées à l'EGF, en présence ou non du peptide TP4. La phosphorylation de l'EGFR a été observée par immunoblot à l'aide d'un anticorps anti-EGFR. Une stimulation à l'EGF induit une phosphorylation transitoire de l'EGFR qui est moins soutenue en présence du TP4.

Chapitre 4. Discussion

4.1 L'oxydation des PTPs régule la signalisation intracellulaire

L'objectif de cette étude était de caractériser l'oxydoréduction de PTP1B dans la signalisation du récepteur à l'EGF. Il est bien que connu que la signalisation de plusieurs facteurs de croissance comme le FGF (Lo & Cruz, 1995), le PDGF (Sundaresan et al., 1995) et l'EGF induisent la formation de ROS intracellulaires tels que le H₂O₂ (Bae et al., 1997). De façon intéressante, les ROS produits suite à l'activation du récepteur à l'EGF ont été montrés pour inactiver réversiblement les PTPs comme PTP1B, créant une rétroaction positive sur le signal du récepteur (Lee et al., 1998).

L'oxydation réversible des PTPs par les ROS constitue un mécanisme crucial de régulation de leur activité enzymatique. En effet, de multiples voies de signalisation dépendent d'un équilibre entre l'action des PTPs et des PTKs et lorsque les PTPs sont transitoirement inactivées, ceci déplace l'équilibre en faveur des PTKs et tend à activer les voies de transduction intracellulaires. Par ce mécanisme, l'oxydation des PTPs pourrait contribuer au développement de plusieurs pathologies chez l'humain (Ostman et al., 2011). D'une part, l'oxydation de PTP1B a été montré pour favoriser la signalisation cellulaire de voies impliquées dans le développement des cancers (Lou et al., 2008). D'autre part, l'inactivation réversible de PTEN par les ROS favorise la signalisation de la voie de la PI3K et PKB (Wu et al., 2013) et pourrait augmenter le développement des cancers (Kitagishi & Matsuda, 2013). D'autres données de la littérature suggèrent que l'oxydation réversible de SHP-2 favorise la signalisation de l'EGFR et l'activation de voies de signalisation impliquées dans le développement de l'hypertrophie chez le rat (J. C. Liu et al., 2009).

4.2 L'oxydation des PTPs induits d'importants changements conformationnels

Les mécanismes d'oxydation des PTPs ont été plutôt bien caractérisés dans les dernières années. En fait, la déphosphorylation des résidus tyrosines par les PTPs s'amorce grâce à un résidu cystéine qui constitue un bon nucléophile, mais qui est aussi très sensible à l'oxydation (Ostman et al., 2011). Plus spécifiquement, l'oxydation réversible de la cystéine catalytique des PTPs par les ROS crée un acide sulfénique rapidement converti en sulphénamide cyclique contenant un lien covalent fort entre la cystéine catalytique et un résidu d'azote. D'après les données de la littérature, les changements conformationnels induits par l'oxydation des PTPs les protégeraient de l'oxydation irréversible tout en favorisant de nouvelles interactions avec des agents réducteurs cellulaires qui permettraient leur réactivation (Salmeen et al., 2003).

Cependant, les mécanismes de réduction de PTP1B restent, à ce jour, mal compris. Quelques études ont néanmoins identifié des systèmes pouvant potentiellement participer à la réactivation de la PTP. Par exemple, un groupe a montré que PTP1B est glutathionylé *in vitro* et que sa forme oxydée pourrait être réactivée par la glutarédoxine (Barrett et al., 1999). Cette glutathionylation permettrait d'autant plus de protéger la phosphatase de l'oxydation irréversible. De plus, Schwertassek et al. montrent que le système de la thiorédoxine réactivent préférentiellement PTEN et PTP1B *in vitro* et qu'une déplétion en thiorédoxine 1 ralentit la réactivation de PTEN (Schwertassek et al., 2014). Des résultats similaires de Dagnell et al. indiquent qu'une déplétion en thiorédoxine 1 augmente l'oxydation de PTP1B, indiquant que le système de la thiorédoxine 1 participerait à l'activation de la forme oxydée de la phosphatase (Dagnell et al., 2013). Ainsi, d'après les plus récentes études, les systèmes réducteurs du glutathion et de la thiorédoxine participeraient à la réactivation des PTPs.

4.3 14-3-3ζ est recrutée suite à l'oxydation de PTP1B

Puisque la littérature supporte qu'il y a un changement conformationnel important dans la forme oxydée de PTP1B (Salmeen et al., 2003), nous avons tenté de caractériser les nouvelles interactions protéiques que peut effectuer PTP1B suite à son oxydation afin de vérifier si celles-ci participent à sa réactivation. Nous avons donc modélisé la structure oxydée de PTP1B et identifié un peptide de la boucle phosphotyrosine de son site catalytique nouvellement exposé au cytosol. Un pull-down, puis une spectrométrie de masse ont permis d'identifier la protéine 14-3-3ζ comme nouveau partenaire d'interaction de PTP1B oxydé.

De façon intéressante, les protéines de la famille des 14-3-3 agissent sous forme dimère et jouent le plus souvent un rôle adaptateur dans des complexes protéiques (Yaffe, 2002). Elles possèdent plus de 200 cibles à l'intérieur de la cellule, leur permettant de réguler de nombreux mécanismes cellulaires (Pozuelo Rubio et al., 2004). Parmi les multiples partenaires d'interaction des 14-3-3, on note des agents réducteurs comme la thiorédoxine, les peroxirédoxines et la glutathion S-transférase. À partir de ces données, nous avons émis l'hypothèse que l'oxydation de PTP1B recrute 14-3-3ζ, une protéine adaptatrice participant à la réduction et la réactivation de la phosphatase.

Suite aux résultats préliminaires que nous avons obtenus, nous avons tenté de vérifier notre hypothèse en caractérisant l'interaction entre PTP1B et 14-3-3ζ in vitro. Par des expériences de co-immunoprécipitations, nous avons confirmé l'interaction entre les deux protéines et que celle-ci était promue par l'oxydation de PTP1B suite à une stimulation à l'EGF. Ces données indiquent que le changement de conformation induit par l'oxydation de PTP1B induit une nouvelle interaction avec la protéine 14-3-3ζ. De plus, seul le NAC, un agent

antioxydant non-spécifique produisant du glutathion à l'intérieur du cytosol, bloquait l'interaction entre les deux protéines, alors que le SS-31 spécifique à la mitochondrie ne présentait aucun effet. Ceci confirme que l'interaction est dépendante de la production de ROS cytosoliques, mais pas des ROS mitochondriaux. L'interaction entre les deux protéines était par ailleurs stabilisée par le mutant CASA de PTP1B, mimant sa forme oxydée, suggérant d'autant plus que 14-3-3 ζ interagit avec la forme oxydée de PTP1B.

4.4 Les protéines 14-3-3 possèdent plusieurs modes d'action

Il est bien connu que les protéines de la famille des 14-3-3 régulent plusieurs mécanismes cellulaires, notamment le cycle cellulaire et même certaines voies de signalisations (Kleppe et al., 2014). Elles ont la particularité d'agir sous forme de dimère, ce qui leur permet de lier plusieurs domaines en même temps et de jouer un rôle régulateur (Yaffe, 2002). Elles facilitent par exemple l'activation des protéines Ras et Raf-1 et elles bloquent l'activation de JNK et p38, leur conférant un rôle important dans la régulation des voies des MAPKs.

De façon intéressante, quelques groupes ont suggéré qu'en plus d'interagir avec des protéines kinases, les 14-3-3 pourraient également réguler des phosphatases. En effet, Zhang et al. ont observé une interaction entre 14-3-3 β et PTPH1 in vitro qui était dépendante de la phosphorylation de la phosphatase sur des sérines contenues dans un motif similaire au motif consensus des 14-3-3 (S. H. Zhang et al., 1997), suggérant que 14-3-3 pourrait jouer un rôle adaptateur dans la régulation de la signalisation impliquant PTPH1. D'autre part, Muslin et al. ont identifié la présence du motif de reconnaissance des 14-3-3 chez PTP-MEG, PTP ϵ et PTP μ (Muslin et al., 1996), alors qu'un autre groupe a identifié par chromatographie PP2A comme

potentiel partenaire d'interaction des 14-3-3 (Pozuelo Rubio et al., 2004), suggérant que les 14-3-3 pourraient être importantes dans la régulation de plusieurs phosphatases.

4.5 L'interaction entre PTP1B et 14-3-3 ζ est dépendante de sa phosphorylation par PKB

Puisque la liaison des 14-3-3 à leur substrat dépend le plus souvent de leur phosphorylation et de la présence d'une séquence similaire au motif consensus de reconnaissance des 14-3-3 (RSXpSXP ou RXXpSXP), nous avons voulu vérifier comment la phosphorylation de PTP1B affecte sa capacité à interagir avec 14-3-3 ζ . Il est bien connu que PTP1B est phosphorylé par PKB sur sa sérine 50 *in vivo* (Ravichandran et al., 2001), et que cette sérine est contenue dans le motif K⁴¹NRNRYRDVS⁵⁰, similaire au motif de reconnaissance des 14-3-3 et nouvellement exposé suite à l'oxydation de PTP1B. Nous avons donc vérifié comment la phosphorylation de PTP1B sur sa sérine 50 affecte son interaction avec 14-3-3 ζ .

Nos résultats montrent une augmentation de la phosphorylation de PTP1B sur sa sérine 50 suite à une stimulation à l'EGF selon le même patron d'interaction avec 14-3-3 ζ . En accord avec l'étude de Ravichandran et al., l'inhibition de PKB par la triciribine empêchait la phosphorylation de PTP1B sur la sérine 50, confirmant que PKB est une kinase qui phosphoryle PTP1B. Puisque la triciribine a également bloqué l'interaction entre les deux protéines, nos résultats suggèrent que l'interaction entre PTP1B et 14-3-3 ζ est dépendante de la phosphorylation de PTP1B sur la sérine 50 par PKB. Ensuite, un CLA montre que l'inhibition de l'activation de PKB favorisait la réduction de PTP1B. Étant donné que 14-3-3 ζ est recrutée suite à l'oxydation de PTP1B et que l'inhibition de de son interaction avec PTP1B favorisait la

réactivation de la PTP, ces données suggèrent que 14-3-3 ζ protège PTP1B de la réduction suite à son oxydation. Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons testé le R18, une molécule qui agit comme inhibiteur des 14-3-3 en empêchant leur interaction avec leur substrat. Comme la triciribine, le R18 bloquait l'interaction entre PTP1B et 14-3-3 ζ tout en favorisant la réactivation de la phosphatase suite à son oxydation. Ensemble, ces résultats suggèrent que 14-3-3 ζ interagit avec la forme oxydée de PTP1B et stabilise sa forme oxydée.

Le R18 est une molécule qui a été largement utilisée afin d'étudier les mécanismes d'action des 14-3-3. Elle a notamment permis de mieux comprendre le rôle des 14-3-3 dans la régulation des voies de signalisations des MAPKs, (Dong et al., 2007), tout en permettant de montrer leur rôle anti-apoptotique (Cao et al., 2010). Une version dimérique du R18 a d'ailleurs été développée, la difopéine, et celle-ci bloque l'interaction avec les 14-3-3 de façon plus efficace que le R18 standard. La modulation des interactions entre les 14-3-3 et leur cibles par des molécules inhibitrices pourrait potentiellement permettre de développer de nouvelles cibles thérapeutiques dans le traitement de diverses pathologies impliquant les 14-3-3 (Zhao et al., 2011).

4.6 Des peptides dérivés de la boucle phosphotyrosine de PTP1B favorisent sa réactivation

Comme nos résultats définissent un rôle important de la séquence K⁴¹NRNRYRDVS⁵⁰ dans l'interaction entre PTP1B et 14-3-3 ζ , nous avons tenté de bloquer cette interaction par compétition en le synthétisant et en le couplant avec un peptide TAT permettant facilement son entrée à l'intérieur de la cellule. À une concentration de 10 μ M, 4 peptides dérivés de la boucle phosphotyrosine de PTP1B bloquaient avec succès son interaction avec 14-3-3 ζ , et le peptide TP4 favorisait sa réactivation rapide suite à une stimulation à l'EGF. Il aurait d'ailleurs été intéressant de tester l'affinité de ces peptides à l'aide de courbes-doses réponses afin de vérifier s'ils agissent tous avec la même affinité.

Ces données confirment que le motif KNRNRYRDVS similaire au motif de reconnaissance des 14-3-3 est essentiel à l'interaction entre les deux protéines. Ensemble, nos résultats indiquent que l'oxydation de PTP1B induit un changement conformationnel important exposant le peptide K⁴¹NRNRYRDVS⁵⁰ de sa boucle phosphotyrosine. Ce changement de conformation promeut une nouvelle interaction avec 14-3-3 ζ qui est dépendante de la phosphorylation de PTP1B sur sa sérine 50 par PKB et qui protège la phosphatase de la réduction.

Les 14-3-3 possèdent un point commun essentiel qui est la capacité de lier des protéines phosphorylées et d'être des adaptateurs dans des complexes protéiques. En fait, leurs nombreux rôles à l'intérieur de la cellule sont le plus souvent définis par leurs cibles elles-mêmes. Elles peuvent permettre de former un complexe entre les différentes protéines en favorisant les interactions (Xiao et al., 1995), un mécanisme qui a d'ailleurs été montré pour permettre l'activation de Raf-1 (Luo et al., 1996). Dans d'autres cas, les 14-3-3 déterminent la localisation

cellulaire de leurs cibles (Muslin & Xing, 2000), ou régulent directement leur activité ou leur fonction (Thorson et al., 1998). D'autres études montrent que les 14-3-3 favorisent la phosphorylation des histones (F. Chen & Wagner, 1994) et régulent la protéolyse de multiples cibles (Cotelle et al., 2000). Les 14-3-3 sont également connues pour empêcher leur cible d'interagir avec d'autres protéines et les protéger de modifications subséquentes (Kosaki et al., 1998). Par exemple, les 14-3-3 régulent la fonction de la protéine BAD (*Bcl-2 associated death promoter*) en la protégeant de la déphosphorylation, qui n'est possible que par la dissociation de 14-3-3 (Chiang et al., 2001). Le mécanisme que nous proposons est similaire à celui-ci en ce sens que 14-3-3 ζ interagit avec PTP1B, stabilise sa forme oxydée et la protège de la réduction.

Afin de vérifier si l'activité de PTP1B est plus élevée en présence d'un peptide de la boucle phosphotyrosine de PTP1B, nous avons tenté de caractériser la phosphorylation de l'EGFR en présence du TP4. Suite à une immunoprécipitation des protéines phosphorylées en tyrosine, nous avons observé une phosphorylation transitoire de l'EGFR qui semble plus rapidement réactivé en présence du TP4. Néanmoins, étant donné que l'EGFR est phosphorylé sur 7 sites différents, que PTP1B ne semble être spécifique qu'à deux de ces sites (Tyr 992 et 1148) (Milarski et al., 1993) et que nous avons caractérisé la phosphorylation de l'EGFR de façon non spécifique, nos données ne nous permettent pas de déterminer si un traitement des cellules au TP4 induit un changement dans la déphosphorylation de l'EGFR par PTP1B. Il serait possible de caractériser la phosphorylation de l'EGFR à l'aide d'anticorps reconnaissant le récepteur phosphorylé de façon spécifique sur ses tyrosines. Une étude similaire montre d'ailleurs une augmentation de la phosphorylation de l'EGFR et du PDGFR dans des cellules déficientes en PTP1B (Haj et al., 2003). Dans le même sens, une autre étude montre qu'une déficience en péroxirédoxines, des enzymes qui empêchent l'inactivation des PTPs, augmente

la phosphorylation du PDGFR sur certaines de ses tyrosines (Choi et al., 2005), suggérant l'intérêt de vérifier si notre peptide affecte la phosphorylation de sites spécifiques de l'EGFR.

4.7 Limites et approches alternatives

L'étude que nous avons effectuée comporte certaines limites. D'une part, le pull-down que nous avons effectué afin d'identifier 14-3-3 ζ comme nouveau partenaire d'interaction de PTP1B oxydé ne comportait aucun contrôle négatif. Le résultat serait plus complet s'il incluait une condition dans laquelle des billes non couplées au peptide sont incubées avec les lysats cellulaires afin de s'assurer que les protéines ne lient pas les billes de sépharose elles-mêmes.

D'autre part, bien que nos résultats montrent l'importance de la phosphorylation de la sérine 50 de PTP1B pour l'interaction avec 14-3-3 ζ , nous avons été en mesure de bloquer l'interaction avec des peptides non phosphorylés en sérine 50 (TP1 et TP4) et des peptides qui ne possèdent pas cette sérine (TP2 et TP3). Ces résultats sont en contradiction avec nos hypothèses puisqu'il est bien connu que les 14-3-3 lient préférentiellement les protéines phosphorylées en sérine ou en thréonine dans un motif de reconnaissance RSXpS/TXP ou RXXXpS/TXP (Yaffe, 2002). Il a néanmoins été montré dans certains cas que les 14-3-3 ont la possibilité de lier des protéines non-phosphorylées telles que la télomérase, qui ne possède pas le motif consensus des 14-3-3 et qui interagit donc de façon indépendante de la phosphorylation (Seimiya et al., 2000). Le précurseur de l'amyloïde- β (Sumioka et al., 2005), ainsi que l'exoenzyme S (Ottmann et al., 2007) sont d'autres exemples qui ont la capacité de lier les 14-3-3 de façon indépendante de la phosphorylation. Ceci dit, puisque nos résultats suggèrent que la phosphorylation de PTP1B est importante pour l'interaction avec 14-3-3 ζ , il serait intéressant de valider nos conclusions en effectuant un pull-down avec une version du peptide TP4

phosphorylée en sérine 50 et de vérifier si elle bloque mieux ou non l'interaction qu'une version non-phosphorylée.

De façon intéressante, sachant que les 14-3-3 sont des protéines qui agissent sous forme de dimère et qui jouent un rôle adaptateur dans des complexes protéiques, il est possible qu'une interaction avec une protéine non-phosphorylée soit observée grâce à une interaction avec un intermédiaire phosphorylé faisant partie du même complexe, une possibilité qui n'est d'ailleurs pas exclue par les groupes de recherche qui ont rapporté ces observations (Johnson et al., 2010). Dans le cadre de notre étude, bien que nous ayons tenté de caractériser l'interaction entre PTP1B et 14-3-3 ζ , nos données ne nous permettent pas de déterminer s'il s'agit d'une interaction directe. Il serait donc intéressant d'effectuer une résonance des plasmons de surface, une méthode permettant d'étudier les interactions entre les protéines. Ce système mesure l'angle de réflexion d'une source de lumière sur une surface métallique, qui varie lorsqu'il y a interaction directe d'une molécule avec une autre adsorbée à la surface. Cette approche permettrait de vérifier si l'interaction entre PTP1B et 14-3-3 ζ est directe et de mieux interpréter nos résultats.

Ensuite, nos données indiquent que les agents que nous avons utilisés afin d'étudier les mécanismes d'oxydoréduction de PTP1B semblaient tous favoriser la réactivation de la phosphatase. Il serait pertinent de vérifier si les effets observés étaient dus à une production altérée ou modifiée de ROS à l'intérieur des cellules suite aux différents traitements. En effet, des études montrent par exemple que l'activation de PKB peut induire une augmentation de la production de ROS intracellulaires, et que son inhibition diminue les niveaux de ROS produits de la mitochondrie (Dolado & Nebreda, 2008). Néanmoins, plusieurs essais permettraient de quantifier la production de ROS cellulaires suite aux différents traitements. Par exemple, la

2',7'-dichlorofluoresceine diacétate est une molécule émettant de la fluorescence suite à son oxydation en 2', 7'-dichlorofluoresceine par les ROS, permettant de mesurer leur production grâce à un spectrophotomètre (X. Chen et al., 2010). D'autres essais utilisent plutôt la 10-acétyle-3,7-dihydroxyphénoxazine, puisqu'elle réagit avec le H₂O₂ afin de produire une molécule fluorescente, la resorufine (Towne et al., 2004). Des résultats préliminaires effectués par d'autres membres de l'équipe de recherche suggèrent que la production de ROS n'est pas affectée par le R18, la triciribine et par le TP4.

Enfin, puisque les 14-3-3 régulent de nombreux mécanismes intracellulaires et que le R18 constitue un inhibiteur non-spécifique de tous les isoformes des 14-3-3, les effets observés dans le cadre de cette étude pourraient être expliqués par d'autres mécanismes que ceux que nous avons proposés. Les 14-3-3 sont d'ailleurs connues pour interagir avec plusieurs protéines du métabolisme réducteur comme la thiorédoxine, les peroxyrédoxines et la glutathion-s-transférase (Pozuelo Rubio et al., 2004) qui pourraient participer à la réduction des PTPs.

Chapitre 5. Conclusion

En conclusion, notre étude montre que l'oxydation de PTP1B induit des changements conformationnels qui exposent un peptide dérivé de sa boucle phosphotyrosine. Ceci promeut une nouvelle interaction avec 14-3-3 ζ , une protéine adaptatrice qui semble stabiliser la forme oxydée de la PTP. Cette interaction semblait être favorisée par la phosphorylation de PTP1B sur sa sérine 50 par PKB, et était bloquée par plusieurs peptides dérivés de la boucle phosphotyrosine de PTP1B et en présence d'inhibiteurs de PKB et des 14-3-3. Dans une perspective intégrative, il serait intéressant de vérifier si ces mécanismes sont spécifiques à PTP1B, ou si certaines phosphatases comme SHP-2 et TC-PTP, qui possèdent une séquence similaire mais non-identique, pourraient aussi être régulées de la même façon. Les plus récentes études suggèrent des mécanismes de réactivation similaires des PTPs par la thiorédoxine et la glutarédoxine. Une approche permettant d'identifier d'autres protéines importantes dans l'oxydoréduction des PTPs serait de purifier le complexe protéique dans lequel se trouvent PTP1B et 14-3-3 ζ par chromatographie.

Enfin, l'utilisation des nouveaux peptides activateurs de PTP1B dans différents contextes cellulaires permettrait de mieux comprendre comment l'oxydation et la réduction de PTP1B affecte la signalisation intracellulaire impliquées dans le développement de pathologies. De nombreuses molécules ayant pour cibles les PTPs comme PTP1B et SHP-2 ont d'ailleurs été récemment développées et pourraient constituer une approche intéressante dans le traitement des cancers (Jiang & Zhang, 2008). En outre, de récents résultats obtenus par l'équipe du Dr. Boivin indiquent que PTP1B est réversiblement oxydé dans des cœurs de souris soumis à une surcharge de pression. De plus, un knock-out cardiaque-spécifique de PTP1B induit une sévère

dysfonction systolique et diastolique chez la souris suite à une surcharge et favorise le développement de l'hypertrophie cardiaque et la transition vers l'insuffisance cardiaque. Ceci suggère que PTP1B participe à la régulation des voies de signalisation impliquées dans l'hypertrophie cardiaque et que des peptides augmentant l'activité de PTP1B pourraient avoir des effets positifs sur l'évolution de la maladie. En somme, considérant le rôle important des ROS et des PTPs dans la régulation des voies de transduction cellulaires impliquées dans les pathologies humaines, une meilleure compréhension des mécanismes d'oxydoréduction des phosphatases constitue une avancée importante dans la découverte de nouvelles cibles thérapeutiques.

Bibliographie

- Aggen, J. B., Nairn, A. C., & Chamberlin, R. (2000). Regulation of protein phosphatase-1. *Chem Biol*, 7(1), R13-23
- Alessi, D. R., Andjelkovic, M., Caudwell, B., Cron, P., Morrice, N., Cohen, P., & Hemmings, B. A. (1996). Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1. *EMBO J*, 15(23), 6541-6551
- Alonso, A., Sasin, J., Bottini, N., Friedberg, I., Friedberg, I., Osterman, A., Godzik, A., Hunter, T., Dixon, J., & Mustelin, T. (2004). Protein tyrosine phosphatases in the human genome. *Cell*, 117(6), 699-711
- Altomare, D. A., & Testa, J. R. (2005). Perturbations of the AKT signaling pathway in human cancer. *Oncogene*, 24(50), 7455-7464
- Bae, Y. S., Kang, S. W., Seo, M. S., Baines, I. C., Tekle, E., Chock, P. B., & Rhee, S. G. (1997). Epidermal growth factor (EGF)-induced generation of hydrogen peroxide. Role in EGF receptor-mediated tyrosine phosphorylation. *J Biol Chem*, 272(1), 217-221
- Bakke, J., & Haj, F. G. (2015). Protein-tyrosine phosphatase 1B substrates and metabolic regulation. *Semin Cell Dev Biol*, 37, 58-65
- Balsamo, J., Arregui, C., Leung, T., & Lilien, J. (1998). The Nonreceptor Protein Tyrosine Phosphatase PTP1B Binds to the Cytoplasmic Domain of N-Cadherin and Regulates the Cadherin-Actin Linkage. *J Cell Biol*, 143(2), 523-532
- Barford, D., Flint, A. J., & Tonks, N. K. (1994). Crystal structure of human protein tyrosine phosphatase 1B. *Science*, 263(5152), 1397-1404
- Barrett, W. C., DeGnore, J. P., Konig, S., Fales, H. M., Keng, Y. F., Zhang, Z. Y., Yim, M. B., & Chock, P. B. (1999). Regulation of PTP1B via glutathionylation of the active site cysteine 215. *Biochemistry*, 38(20), 6699-6705
- Berenji, K., Drazner, M. H., Rothermel, B. A., & Hill, J. A. (2005). Does load-induced ventricular hypertrophy progress to systolic heart failure? *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 289(1), H8-h16
- Birk, A. V., Liu, S., Soong, Y., Mills, W., Singh, P., Warren, J. D., Seshan, S. V., Pardee, J. D., & Szeto, H. H. (2013). The mitochondrial-targeted compound SS-31 re-energizes ischemic mitochondria by interacting with cardiolipin. *J Am Soc Nephrol*, 24(8), 1250-1261
- Bjorge, J. D., Pang, A., & Fujita, D. J. (2000). Identification of protein-tyrosine phosphatase 1B as the major tyrosine phosphatase activity capable of dephosphorylating and activating c-Src in several human breast cancer cell lines. *J Biol Chem*, 275(52), 41439-41446
- Boivin, B., Yang, M., & Tonks, N. K. (2010). Targeting the reversibly oxidized protein tyrosine phosphatase superfamily. *Sci Signal*, 3(137), p12
- Boivin, B., Zhang, S., Arbiser, J. L., Zhang, Z. Y., & Tonks, N. K. (2008). A modified cysteinyl-labeling assay reveals reversible oxidation of protein tyrosine phosphatases in angiomyolipoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105(29), 9959-9964
- Boutros, T., Chevet, E., & Metrakos, P. (2008). Mitogen-activated protein (MAP) kinase/MAP kinase phosphatase regulation: roles in cell growth, death, and cancer. *Pharmacol Rev*, 60(3), 261-310

- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, *72*, 248-254
- Brancaccio, M., Fratta, L., Notte, A., Hirsch, E., Poulet, R., Guazzone, S., De Acetis, M., Vecchione, C., Marino, G., Altruda, F., Silengo, L., Tarone, G., & Lembo, G. (2003). Melusin, a muscle-specific integrin beta1-interacting protein, is required to prevent cardiac failure in response to chronic pressure overload. *Nat Med*, *9*(1), 68-75
- Bueno, O. F., De Windt, L. J., Tymitz, K. M., Witt, S. A., Kimball, T. R., Klevitsky, R., Hewett, T. E., Jones, S. P., Lefer, D. J., Peng, C. F., Kitsis, R. N., & Molkenstein, J. D. (2000). The MEK1-ERK1/2 signaling pathway promotes compensated cardiac hypertrophy in transgenic mice. *EMBO J*, *19*(23), 6341-6350
- Cao, W., Yang, X., Zhou, J., Teng, Z., Cao, L., Zhang, X., & Fei, Z. (2010). Targeting 14-3-3 protein, difopein induces apoptosis of human glioma cells and suppresses tumor growth in mice. *Apoptosis*, *15*(2), 230-241
- Cattaneo, F., Guerra, G., Parisi, M., De Marinis, M., Tafuri, D., Cinelli, M., & Ammendola, R. (2014). Cell-surface receptors transactivation mediated by G protein-coupled receptors. *Int J Mol Sci*, *15*(11), 19700-19728
- Cattaneo, F., Iaccio, A., Guerra, G., Montagnani, S., & Ammendola, R. (2011). NADPH-oxidase-dependent reactive oxygen species mediate EGFR transactivation by FPRL1 in WKYMVm-stimulated human lung cancer cells. *Free Radic Biol Med*, *51*(6), 1126-1136
- Chen, F., & Wagner, P. D. (1994). 14-3-3 proteins bind to histone and affect both histone phosphorylation and dephosphorylation. *FEBS Lett*, *347*(2-3), 128-132
- Chen, X., Zhong, Z., Xu, Z., Chen, L., & Wang, Y. (2010). 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein as a fluorescent probe for reactive oxygen species measurement: Forty years of application and controversy. *Free Radic Res*, *44*(6), 587-604
- Chiang, C. W., Harris, G., Ellig, C., Masters, S. C., Subramanian, R., Shenolikar, S., Wadzinski, B. E., & Yang, E. (2001). Protein phosphatase 2A activates the proapoptotic function of BAD in interleukin-3-dependent lymphoid cells by a mechanism requiring 14-3-3 dissociation. *Blood*, *97*(5), 1289-1297
- Chiarugi, P., Cirri, P., Marra, F., Raugei, G., Camici, G., Manao, G., & Ramponi, G. (1997). LMW-PTP is a negative regulator of insulin-mediated mitotic and metabolic signalling. *Biochem Biophys Res Commun*, *238*(2), 676-682
- Cho, H. (2013). Protein tyrosine phosphatase 1B (PTP1B) and obesity. *Vitam Horm*, *91*, 405-424
- Choi, M. H., Lee, I. K., Kim, G. W., Kim, B. U., Han, Y. H., Yu, D. Y., Park, H. S., Kim, K. Y., Lee, J. S., Choi, C., Bae, Y. S., Lee, B. I., Rhee, S. G., & Kang, S. W. (2005). Regulation of PDGF signalling and vascular remodelling by peroxiredoxin II. *Nature*, *435*(7040), 347-353
- Cotelle, V., Meek, S. E., Provan, F., Milne, F. C., Morrice, N., & MacKintosh, C. (2000). 14-3-3s regulate global cleavage of their diverse binding partners in sugar-starved Arabidopsis cells. *EMBO J*, *19*(12), 2869-2876
- Couchonnal, L. F., & Anderson, M. E. (2008). The role of calmodulin kinase II in myocardial physiology and disease. *Physiology (Bethesda)*, *23*, 151-159
- Dagnell, M., Frijhoff, J., Pader, I., Augsten, M., Boivin, B., Xu, J., Mandal, P. K., Tonks, N. K., Hellberg, C., Conrad, M., Arner, E. S., & Ostman, A. (2013). Selective activation of

- oxidized PTP1B by the thioredoxin system modulates PDGF-beta receptor tyrosine kinase signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110(33), 13398-13403
- Dance, M., Montagner, A., Salles, J. P., Yart, A., & Raynal, P. (2008). The molecular functions of Shp2 in the Ras/Mitogen-activated protein kinase (ERK1/2) pathway. *Cell Signal*, 20(3), 453-459
- Daub, H., Wallasch, C., Lankenau, A., Herrlich, A., & Ullrich, A. (1997). Signal characteristics of G protein-transactivated EGF receptor. *EMBO J*, 16(23), 7032-7044
- Daub, H., Weiss, F. U., Wallasch, C., & Ullrich, A. (1996). Role of transactivation of the EGF receptor in signalling by G-protein-coupled receptors. *Nature*, 379(6565), 557-560
- De Flora, S., Izzotti, A., D'Agostini, F., & Balansky, R. M. (2001). Mechanisms of N-acetylcysteine in the prevention of DNA damage and cancer, with special reference to smoking-related end-points. *Carcinogenesis*, 22(7), 999-1013
- Dolado, I., & Nebreda, A. R. (2008). AKT and oxidative stress team up to kill cancer cells. *Cancer Cell*, 14(6), 427-429
- Dong, S., Kang, S., Gu, T. L., Kardar, S., Fu, H., Lonial, S., Khoury, H. J., Khuri, F., & Chen, J. (2007). 14-3-3 Integrates prosurvival signals mediated by the AKT and MAPK pathways in ZNF198-FGFR1-transformed hematopoietic cells. *Blood*, 110(1), 360-369
- Elchebly, M., Payette, P., Michaliszyn, E., Cromlish, W., Collins, S., Loy, A. L., Normandin, D., Cheng, A., Himms-Hagen, J., Chan, C. C., Ramachandran, C., Gresser, M. J., Tremblay, M. L., & Kennedy, B. P. (1999). Increased insulin sensitivity and obesity resistance in mice lacking the protein tyrosine phosphatase-1B gene. *Science*, 283(5407), 1544-1548
- Feldhammer, M., Uetani, N., Miranda-Saavedra, D., & Tremblay, M. L. (2013). PTP1B: a simple enzyme for a complex world. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 48(5), 430-445
- Ferrari, E., Tinti, M., Costa, S., Corallino, S., Nardoza, A. P., Chatranyamonti, A., Ceol, A., Cesareni, G., & Castagnoli, L. (2011). Identification of New Substrates of the Protein-tyrosine Phosphatase PTP1B by Bayesian Integration of Proteome Evidence. *J Biol Chem*, 286(6), 4173-4185
- Fischer, E. H. (1993). Protein Phosphorylation and Cellular Regulation II (Nobel Lecture). *Angewandte Chemie International Edition in English*, 32(8), 1130-1137
- Frangioni, J. V., Beahm, P. H., Shifrin, V., Jost, C. A., & Neel, B. G. (1992). The nontransmembrane tyrosine phosphatase PTP-1B localizes to the endoplasmic reticulum via its 35 amino acid C-terminal sequence. *Cell*, 68(3), 545-560
- Frankel, A. D., & Pabo, C. O. (1988). Cellular uptake of the tat protein from human immunodeficiency virus. *Cell*, 55(6), 1189-1193
- Frey, N., Katus, H. A., Olson, E. N., & Hill, J. A. (2004). Hypertrophy of the heart: a new therapeutic target? *Circulation*, 109(13), 1580-1589
- Fukai, T., & Ushio-Fukai, M. (2011). Superoxide Dismutases: Role in Redox Signaling, Vascular Function, and Diseases. *Antioxid Redox Signal*, 15(6), 1583-1606
- Galic, S., Hauser, C., Kahn, B. B., Haj, F. G., Neel, B. G., Tonks, N. K., & Tiganis, T. (2005). Coordinated Regulation of Insulin Signaling by the Protein Tyrosine Phosphatases PTP1B and TCPTP. *Molecular and Cellular Biology*, 25(2), 819-829
- Garrington, T. P., & Johnson, G. L. (1999). Organization and regulation of mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *Curr Opin Cell Biol*, 11(2), 211-218

- Gaziano, T. A., Bitton, A., Anand, S., Abrahams-Gessel, S., & Murphy, A. (2010). Growing epidemic of coronary heart disease in low- and middle-income countries. *Curr Probl Cardiol*, 35(2), 72-115
- Gersh, B. J., Sliwa, K., Mayosi, B. M., & Yusuf, S. (2010). Novel therapeutic concepts: the epidemic of cardiovascular disease in the developing world: global implications. *Eur Heart J*, 31(6), 642-648
- Goldstein, B. J., Bittner-Kowalczyk, A., White, M. F., & Harbeck, M. (2000). Tyrosine dephosphorylation and deactivation of insulin receptor substrate-1 by protein-tyrosine phosphatase 1B. Possible facilitation by the formation of a ternary complex with the Grb2 adaptor protein. *J Biol Chem*, 275(6), 4283-4289
- Greenwald, R. A. (1990). Superoxide dismutase and catalase as therapeutic agents for human diseases. A critical review. *Free Radic Biol Med*, 8(2), 201-209
- Guo, S. (2014). Insulin Signaling, Resistance, and the Metabolic Syndrome: Insights from Mouse Models to Disease Mechanisms. *J Endocrinol*, 220(2), T1-T23
- Gurusamy, N., Watanabe, K., Ma, M., Zhang, S., Muslin, A. J., Kodama, M., & Aizawa, Y. (2005). Inactivation of 14-3-3 protein exacerbates cardiac hypertrophy and fibrosis through enhanced expression of protein kinase C beta 2 in experimental diabetes. *Biol Pharm Bull*, 28(6), 957-962
- Haider, A. W., Larson, M. G., Benjamin, E. J., & Levy, D. (1998). Increased left ventricular mass and hypertrophy are associated with increased risk for sudden death. *J Am Coll Cardiol*, 32(5), 1454-1459
- Haj, F. G., Markova, B., Klamann, L. D., Bohmer, F. D., & Neel, B. G. (2003). Regulation of receptor tyrosine kinase signaling by protein tyrosine phosphatase-1B. *J Biol Chem*, 278(2), 739-744
- Haque, A., Andersen, J. N., Salmeen, A., Barford, D., & Tonks, N. K. (2011). Conformation-sensing antibodies stabilize the oxidized form of PTP1B and inhibit its phosphatase activity. *Cell*, 147(1), 185-198
- Heeneman, S., Haendeler, J., Saito, Y., Ishida, M., & Berk, B. C. (2000). Angiotensin II induces transactivation of two different populations of the platelet-derived growth factor beta receptor. Key role for the p66 adaptor protein Shc. *J Biol Chem*, 275(21), 15926-15932
- Heineke, J., & Molkentin, J. D. (2006). Regulation of cardiac hypertrophy by intracellular signalling pathways. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 7(8), 589-600
- Heppner, D. E., & van der Vliet, A. (2016). Redox-dependent regulation of epidermal growth factor receptor signaling. *Redox Biol*, 8, 24-27
- Hers, I., Vincent, E. E., & Tavare, J. M. (2011). Akt signalling in health and disease. *Cell Signal*, 23(10), 1515-1527
- Holmstrom, K. M., & Finkel, T. (2014). Cellular mechanisms and physiological consequences of redox-dependent signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 15(6), 411-421
- Hubbard, S. R., & Till, J. H. (2000). Protein tyrosine kinase structure and function. *Annu Rev Biochem*, 69, 373-398
- Hunt, S., Abraham, W., Chin, M., Feldman, A., Francis, G., Ganiats, T., Jessup, M., Konstam, M., Mancini, D., Michl, K., Oates, J., Rahko, P., Silver, M., Stevenson, L., Yancy, C., Antman, E., Smith, S. J., Adams, C., Anderson, J., Faxon, D., Fuster V, H., alperin, J., Hiratzka, L., Jacobs, A., Nishimura, R., Ornato, J., Page, R., Riegel, B., American College of Cardiology, American Heart Association Task Force on Practice Guidelines, American College of Chest Physicians, & International Society for Heart and Lung

- Transplantation; Heart Rhythm Society. (2005). ACC/AHA 2005 guideline update for the diagnosis and management of chronic heart failure in the adult: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (Writing Committee to Update the 2001 Guidelines for the Evaluation and Management of Heart Failure). *J Am Coll Cardiol*, 46(6), e1-82
- Ibarra-Sanchez, M. J., Simoncic, P. D., Nestel, F. R., Duplay, P., Lapp, W. S., & Tremblay, M. L. (2000). The T-cell protein tyrosine phosphatase. *Semin Immunol*, 12(4), 379-386
- Israeli-Rosenberg, S., Manso, A. M., Okada, H., & Ross, R. S. (2014). Integrins and integrin-associated proteins in the cardiac myocyte. *Circ Res*, 114(3), 572-586
- Jaumot, M., & Hancock, J. F. (2001). Protein phosphatases 1 and 2A promote Raf-1 activation by regulating 14-3-3 interactions. *Oncogene*, 20(30), 3949-3958
- Jemc, J., & Rebay, I. (2007). The eyes absent family of phosphotyrosine phosphatases: properties and roles in developmental regulation of transcription. *Annu Rev Biochem*, 76, 513-538
- Jessup, M., & Brozena, S. (2003). Heart failure. *N Engl J Med*, 348(20), 2007-2018
- Jiang, Z. X., & Zhang, Z. Y. (2008). Targeting PTPs with small molecule inhibitors in cancer treatment. *Cancer Metastasis Rev*, 27(2), 263-272
- Johnson, C., Crowther, S., Stafford, Margaret J., Campbell, David G., Toth, R., & MacKintosh, C. (2010). Bioinformatic and experimental survey of 14-3-3-binding sites. *Biochemical Journal*, 427(Pt 1), 69-78
- Kathiresan, S., & Srivastava, D. (2012). Genetics of human cardiovascular disease. *Cell*, 148(6), 1242-1257
- Kenner, K. A., Anyanwu, E., Olefsky, J. M., & Kusari, J. (1996). Protein-tyrosine phosphatase 1B is a negative regulator of insulin- and insulin-like growth factor-I-stimulated signaling. *J Biol Chem*, 271(33), 19810-19816
- Kitagishi, Y., & Matsuda, S. (2013). Redox regulation of tumor suppressor PTEN in cancer and aging (Review). *Int J Mol Med*, 31(3), 511-515
- Kivimaki, M., Jokela, M., Nyberg, S. T., Singh-Manoux, A., Fransson, E. I., Alfredsson, L., Bjorner, J. B., Borritz, M., Burr, H., Casini, A., Clays, E., De Bacquer, D., Dragano, N., Erbel, R., Geuskens, G. A., Hamer, M., Hooftman, W. E., Houtman, I. L., Jockel, K. H., Kittel, F., Knutsson, A., Koskenvuo, M., Lunau, T., Madsen, I. E., Nielsen, M. L., Nordin, M., Oksanen, T., Pejtersen, J. H., Pentti, J., Rugulies, R., Salo, P., Shipley, M. J., Siegrist, J., Steptoe, A., Suominen, S. B., Theorell, T., Vahtera, J., Westerholm, P. J., Westerlund, H., O'Reilly, D., Kumari, M., Batty, G. D., Ferrie, J. E., Virtanen, M., & Consortium, I. P.-W. (2015). Long working hours and risk of coronary heart disease and stroke: a systematic review and meta-analysis of published and unpublished data for 603,838 individuals. *Lancet*, 386(10005), 1739-1746
- Klaman, L. D., Boss, O., Peroni, O. D., Kim, J. K., Martino, J. L., Zabolotny, J. M., Moghal, N., Lubkin, M., Kim, Y. B., Sharpe, A. H., Stricker-Krongrad, A., Shulman, G. I., Neel, B. G., & Kahn, B. B. (2000). Increased energy expenditure, decreased adiposity, and tissue-specific insulin sensitivity in protein-tyrosine phosphatase 1B-deficient mice. *Mol Cell Biol*, 20(15), 5479-5489
- Kleppe, R., Ghorbani, S., Martinez, A., & Haavik, J. (2014). Modelling cellular signal communication mediated by phosphorylation dependent interaction with 14-3-3 proteins. *FEBS Lett*, 588(1), 92-98

- Kobilka, B. K. (2007). G protein coupled receptor structure and activation. *Biochim Biophys Acta*, 1768(4), 794-807
- Kosaki, A., Yamada, K., Suga, J., Otaka, A., & Kuzuya, H. (1998). 14-3-3beta protein associates with insulin receptor substrate 1 and decreases insulin-stimulated phosphatidylinositol 3'-kinase activity in 3T3L1 adipocytes. *J Biol Chem*, 273(2), 940-944
- Kostich, M., English, J., Madison, V., Gheyas, F., Wang, L., Qiu, P., Greene, J., & Laz, T. M. (2002). Human members of the eukaryotic protein kinase family. *Genome Biol*, 3(9), RESEARCH0043
- Kozer, N., Barua, D., Henderson, C., Nice, E. C., Burgess, A. W., Hlavacek, W. S., & Clayton, A. H. (2014). Recruitment of the adaptor protein Grb2 to EGFR tetramers. *Biochemistry*, 53(16), 2594-2604
- Krebs, E. G. (1993). Protein Phosphorylation and Cellular Regulation I (Nobel Lecture). *Angewandte Chemie International Edition in English*, 32(8), 1122-1129
- Kypta, R. M., Su, H., & Reichardt, L. F. (1996). Association between a transmembrane protein tyrosine phosphatase and the cadherin-catenin complex. *J Cell Biol*, 134(6), 1519-1529
- Lee, S. R., Kwon, K. S., Kim, S. R., & Rhee, S. G. (1998). Reversible inactivation of protein-tyrosine phosphatase 1B in A431 cells stimulated with epidermal growth factor. *J Biol Chem*, 273(25), 15366-15372
- Lemmon, M. A., & Schlessinger, J. (2010). Cell signaling by receptor-tyrosine kinases. *Cell*, 141(7), 1117-1134
- Lemmon, M. A., & Schlessinger, J. (2010). Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell*, 141(7), 1117-1134
- Lessard, L., Stuiblé, M., & Tremblay, M. L. (2010). The two faces of PTP1B in cancer. *Biochim Biophys Acta*, 1804(3), 613-619
- Letourneau, C., Rocher, G., & Porteu, F. (2006). B56-containing PP2A dephosphorylate ERK and their activity is controlled by the early gene IEX-1 and ERK. *EMBO J*, 25(4), 727-738
- Li, L., & Dixon, J. E. (2000). Form, function, and regulation of protein tyrosine phosphatases and their involvement in human diseases. *Semin Immunol*, 12(1), 75-84
- Liu, J. C., Chen, C. H., Chen, J. J., & Cheng, T. H. (2009). Urotensin II induces rat cardiomyocyte hypertrophy via the transient oxidization of Src homology 2-containing tyrosine phosphatase and transactivation of epidermal growth factor receptor. *Mol Pharmacol*, 76(6), 1186-1195
- Liu, P., Begley, M., Michowski, W., Inuzuka, H., Ginzberg, M., Gao, D., Tsou, P., Gan, W., Papa, A., Kim, B. M., Wan, L., Singh, A., Zhai, B., Yuan, M., Wang, Z., Gygi, S. P., Lee, T. H., Lu, K.-P., Toker, A., Pandolfi, P. P., Asara, J. M., Kirschner, M. W., Sicinski, P., Cantley, L., & Wei, W. (2014). Cell-cycle-regulated activation of Akt kinase by phosphorylation at its carboxyl terminus. *Nature*, 508(7497), 541-545
- Lo, Y. Y., & Cruz, T. F. (1995). Involvement of reactive oxygen species in cytokine and growth factor induction of c-fos expression in chondrocytes. *J Biol Chem*, 270(20), 11727-11730
- Lou, Y. W., Chen, Y. Y., Hsu, S. F., Chen, R. K., Lee, C. L., Khoo, K. H., Tonks, N. K., & Meng, T. C. (2008). Redox regulation of the protein tyrosine phosphatase PTP1B in cancer cells. *FEBS J*, 275(1), 69-88

- Luo, Z., Tzivion, G., Belshaw, P. J., Vavvas, D., Marshall, M., & Avruch, J. (1996). Oligomerization activates c-Raf-1 through a Ras-dependent mechanism. *Nature*, 383(6596), 181-185
- Mackintosh, C. (2004). Dynamic interactions between 14-3-3 proteins and phosphoproteins regulate diverse cellular processes. *Biochem J*, 381(Pt 2), 329-342
- Manning, B. D., & Cantley, L. C. (2007). AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell*, 129(7), 1261-1274
- Manning, G., Whyte, D. B., Martinez, R., Hunter, T., & Sudarsanam, S. (2002). The protein kinase complement of the human genome. *Science*, 298(5600), 1912-1934
- Mendis, S., Puska, P., Norrving, B., Organization, W. H., Federation, W. H., & Organization, W. S. (2011). *Global Atlas on Cardiovascular Disease Prevention and Control*: World Health Organization in collaboration with the World Heart Federation and the World Stroke Organization.
- Meng, K., Rodriguez-Pena, A., Dimitrov, T., Chen, W., Yamin, M., Noda, M., & Deuel, T. F. (2000). Pleiotrophin signals increased tyrosine phosphorylation of beta beta-catenin through inactivation of the intrinsic catalytic activity of the receptor-type protein tyrosine phosphatase beta/zeta. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(6), 2603-2608
- Milarski, K. L., Zhu, G., Pearl, C. G., McNamara, D. J., Dobrusin, E. M., MacLean, D., Thieme-Sefler, A., Zhang, Z. Y., Sawyer, T., Decker, S. J., & et al. (1993). Sequence specificity in recognition of the epidermal growth factor receptor by protein tyrosine phosphatase 1B. *J Biol Chem*, 268(31), 23634-23639
- Mozaffarian, D., Benjamin, E. J., Go, A. S., Arnett, D. K., Blaha, M. J., Cushman, M., Das, S. R., de Ferranti, S., Despres, J. P., Fullerton, H. J., Howard, V. J., Huffman, M. D., Isasi, C. R., Jimenez, M. C., Judd, S. E., Kissela, B. M., Lichtman, J. H., Lisabeth, L. D., Liu, S., Mackey, R. H., Magid, D. J., McGuire, D. K., Mohler, E. R., 3rd, Moy, C. S., Muntner, P., Mussolino, M. E., Nasir, K., Neumar, R. W., Nichol, G., Palaniappan, L., Pandey, D. K., Reeves, M. J., Rodriguez, C. J., Rosamond, W., Sorlie, P. D., Stein, J., Towfighi, A., Turan, T. N., Virani, S. S., Woo, D., Yeh, R. W., Turner, M. B., American Heart Association Statistics, C., & Stroke Statistics, S. (2016). Heart Disease and Stroke Statistics-2016 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation*, 133(4), e38-360
- Muslin, A. J., Tanner, J. W., Allen, P. M., & Shaw, A. S. (1996). Interaction of 14-3-3 with signaling proteins is mediated by the recognition of phosphoserine. *Cell*, 84(6), 889-897
- Muslin, A. J., & Xing, H. (2000). 14-3-3 proteins: regulation of subcellular localization by molecular interference. *Cell Signal*, 12(11-12), 703-709
- Myers, M. P., Andersen, J. N., Cheng, A., Tremblay, M. L., Horvath, C. M., Parisien, J. P., Salmeen, A., Barford, D., & Tonks, N. K. (2001). TYK2 and JAK2 are substrates of protein-tyrosine phosphatase 1B. *J Biol Chem*, 276(51), 47771-47774
- Normanno, N., De Luca, A., Bianco, C., Strizzi, L., Mancino, M., Maiello, M. R., Carotenuto, A., De Feo, G., Caponigro, F., & Salomon, D. S. (2006). Epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling in cancer. *Gene*, 366(1), 2-16
- Obsil, T., & Obsilova, V. (2011). Structural basis of 14-3-3 protein functions. *Semin Cell Dev Biol*, 22(7), 663-672
- Oda, K., Matsuoka, Y., Funahashi, A., & Kitano, H. (2005). A comprehensive pathway map of epidermal growth factor receptor signaling. *Mol Syst Biol*, 1, 2005.0010-2005.0010

- Oh, H., Jung, H. Y., Kim, J., & Bae, Y. S. (2010). Phosphorylation of serine282 in NADPH oxidase activator 1 by Erk desensitizes EGF-induced ROS generation. *Biochem Biophys Res Commun*, 394(3), 691-696
- Ojeda, L., Gao, J., Hooten, K. G., Wang, E., Thonhoff, J. R., Dunn, T. J., Gao, T., & Wu, P. (2011). Critical Role of PI3K/Akt/GSK3 β in Motoneuron Specification from Human Neural Stem Cells in Response to FGF2 and EGF. *PLoS ONE*, 6(8), e23414
- Oldham, W. M., & Hamm, H. E. (2008). Heterotrimeric G protein activation by G-protein-coupled receptors. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 9(1), 60-71
- Oligny-Longpre, G., Corbani, M., Zhou, J., Hogue, M., Guillon, G., & Bouvier, M. (2012). Engagement of beta-arrestin by transactivated insulin-like growth factor receptor is needed for V2 vasopressin receptor-stimulated ERK1/2 activation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109(17), E1028-1037
- Ostman, A., Frijhoff, J., Sandin, A., & Bohmer, F. D. (2011). Regulation of protein tyrosine phosphatases by reversible oxidation. *J Biochem*, 150(4), 345-356
- Ottmann, C., Yasmin, L., Weyand, M., Veessenmeyer, J. L., Diaz, M. H., Palmer, R. H., Francis, M. S., Hauser, A. R., Wittinghofer, A., & Hallberg, B. (2007). Phosphorylation-independent interaction between 14-3-3 and exoenzyme S: from structure to pathogenesis. *EMBO J*, 26(3), 902-913
- Oudit, G. Y., Sun, H., Kerfant, B. G., Crackower, M. A., Penninger, J. M., & Backx, P. H. (2004). The role of phosphoinositide-3 kinase and PTEN in cardiovascular physiology and disease. *J Mol Cell Cardiol*, 37(2), 449-471
- Parsons, S. J., & Parsons, J. T. (2004). Src family kinases, key regulators of signal transduction. *Oncogene*, 23(48), 7906-7909
- Pereira, S. R., Vasconcelos, V. M., & Antunes, A. (2011). The phosphoprotein phosphatase family of Ser/Thr phosphatases as principal targets of naturally occurring toxins. *Crit Rev Toxicol*, 41(2), 83-110
- Peters, G. H., Frimurer, T. M., & Olsen, O. H. (1998). Electrostatic evaluation of the signature motif (H/V)CX5R(S/T) in protein-tyrosine phosphatases. *Biochemistry*, 37(16), 5383-5393
- Pozuelo Rubio, M., Geraghty, K. M., Wong, B. H., Wood, N. T., Campbell, D. G., Morrice, N., & Mackintosh, C. (2004). 14-3-3-affinity purification of over 200 human phosphoproteins reveals new links to regulation of cellular metabolism, proliferation and trafficking. *Biochem J*, 379(Pt 2), 395-408
- Raju, T. N. (2000). The Nobel chronicles. 1992: Edmond H Fischer (b 1920) and Edwin G Krebs (b 1918). *Lancet*, 355(9219), 2004
- Rauch, B. H., Millette, E., Kenagy, R. D., Daum, G., & Clowes, A. W. (2004). Thrombin- and factor Xa-induced DNA synthesis is mediated by transactivation of fibroblast growth factor receptor-1 in human vascular smooth muscle cells. *Circ Res*, 94(3), 340-345
- Raugei, G., Ramponi, G., & Chiarugi, P. (2002). Low molecular weight protein tyrosine phosphatases: small, but smart. *Cell Mol Life Sci*, 59(6), 941-949
- Ravichandran, L. V., Chen, H., Li, Y., & Quon, M. J. (2001). Phosphorylation of PTP1B at Ser(50) by Akt impairs its ability to dephosphorylate the insulin receptor. *Mol Endocrinol*, 15(10), 1768-1780
- Ray, P. D., Huang, B. W., & Tsuji, Y. (2012). Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cell Signal*, 24(5), 981-990

- Roskoski, R., Jr. (2012). MEK1/2 dual-specificity protein kinases: structure and regulation. *Biochem Biophys Res Commun*, 417(1), 5-10
- Ruwhof, C., & van der Laarse, A. (2000). Mechanical stress-induced cardiac hypertrophy: mechanisms and signal transduction pathways. *Cardiovasc Res*, 47(1), 23-37
- Salazar, N. C., Chen, J., & Rockman, H. A. (2007). Cardiac GPCRs: GPCR signaling in healthy and failing hearts. *Biochim Biophys Acta*, 1768(4), 1006-1018
- Salmeen, A., Andersen, J. N., Myers, M. P., Meng, T. C., Hinks, J. A., Tonks, N. K., & Barford, D. (2003). Redox regulation of protein tyrosine phosphatase 1B involves a sulphenylamide intermediate. *Nature*, 423(6941), 769-773
- Salmeen, A., Andersen, J. N., Myers, M. P., Tonks, N. K., & Barford, D. (2000). Molecular basis for the dephosphorylation of the activation segment of the insulin receptor by protein tyrosine phosphatase 1B. *Mol Cell*, 6(6), 1401-1412
- Sarbassov, D. D., Guertin, D. A., Ali, S. M., & Sabatini, D. M. (2005). Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science*, 307(5712), 1098-1101
- Schieber, M., & Chandel, N. S. (2014). ROS function in redox signaling and oxidative stress. *Curr Biol*, 24(10), R453-462
- Schwertassek, U., Haque, A., Krishnan, N., Greiner, R., Weingarten, L., Dick, T. P., & Tonks, N. K. (2014). Reactivation of oxidized PTP1B and PTEN by Thioredoxin 1. *FEBS J*
- Seifried, A., Bergeron, A., Boivin, B., & Gohla, A. (2016). Reversible oxidation controls the activity and oligomeric state of the mammalian phosphoglycolate phosphatase AUM. *Free Radic Biol Med*, 97, 75-84
- Seifried, A., Knobloch, G., Duraphe, P. S., Segerer, G., Manhard, J., Schindelin, H., Schultz, J., & Gohla, A. (2014). Evolutionary and structural analyses of mammalian haloacid dehalogenase-type phosphatases AUM and chronophin provide insight into the basis of their different substrate specificities. *J Biol Chem*, 289(6), 3416-3431
- Seifried, A., Schultz, J., & Gohla, A. (2013). Human HAD phosphatases: structure, mechanism, and roles in health and disease. *FEBS J*, 280(2), 549-571
- Seimiya, H., Sawada, H., Muramatsu, Y., Shimizu, M., Ohko, K., Yamane, K., & Tsuruo, T. (2000). Involvement of 14-3-3 proteins in nuclear localization of telomerase. *EMBO J*, 19(11), 2652-2661
- Shi, Y. (2009). Serine/threonine phosphatases: mechanism through structure. *Cell*, 139(3), 468-484
- Shimizu, I., & Minamino, T. (2016). Physiological and pathological cardiac hypertrophy. *J Mol Cell Cardiol*, 97, 245-262
- Shiroma, E. J., & Lee, I. M. (2010). Physical activity and cardiovascular health: lessons learned from epidemiological studies across age, gender, and race/ethnicity. *Circulation*, 122(7), 743-752
- Song, G., Ouyang, G., & Bao, S. (2005). The activation of Akt/PKB signaling pathway and cell survival. *J Cell Mol Med*, 9(1), 59-71
- Sreedhar, R., Arumugam, S., Thandavarayan, R. A., Giridharan, V. V., Karuppagounder, V., Pitchaimani, V., Afrin, R., Harima, M., Nakamura, M., Suzuki, K., Gurusamy, N., Krishnamurthy, P., & Watanabe, K. (2016). Depletion of cardiac 14-3-3eta protein adversely influences pathologic cardiac remodeling during myocardial infarction after coronary artery ligation in mice. *Int J Cardiol*, 202, 146-153
- Stanford, S. M., Aleshin, A. E., Zhang, V., Ardecky, R. J., Hedrick, M. P., Zou, J., Ganji, S. R., Bliss, M. R., Yamamoto, F., Bobkov, A. A., Kiselar, J., Liu, Y., Cadwell, G. W., Khare,

- S., Yu, J., Barquilla, A., Chung, T. D. Y., Mustelin, T., Schenk, S., Bankston, L. A., Liddington, R. C., Pinkerton, A. B., & Bottini, N. (2017). Diabetes reversal by inhibition of the low-molecular-weight tyrosine phosphatase. *Nat Chem Biol*, *13*(6), 624-632
- Stoker, A. W. (2005). Protein tyrosine phosphatases and signalling. *J Endocrinol*, *185*(1), 19-33
- Sumioka, A., Nagaishi, S., Yoshida, T., Lin, A., Miura, M., & Suzuki, T. (2005). Role of 14-3-3gamma in FE65-dependent gene transactivation mediated by the amyloid beta-protein precursor cytoplasmic fragment. *J Biol Chem*, *280*(51), 42364-42374
- Sundaresan, M., Yu, Z. X., Ferrans, V. J., Irani, K., & Finkel, T. (1995). Requirement for generation of H₂O₂ for platelet-derived growth factor signal transduction. *Science*, *270*(5234), 296-299
- Tamrakar, A. K., Maurya, C. K., & Rai, A. K. (2014). PTP1B inhibitors for type 2 diabetes treatment: a patent review (2011 - 2014). *Expert Opin Ther Pat*, *24*(10), 1101-1115
- Tanimoto, T., Jin, Z. G., & Berk, B. C. (2002). Transactivation of vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor Flk-1/KDR is involved in sphingosine 1-phosphate-stimulated phosphorylation of Akt and endothelial nitric-oxide synthase (eNOS). *J Biol Chem*, *277*(45), 42997-43001
- Tarride, J.-E., Lim, M., DesMeules, M., Luo, W., Burke, N., O'Reilly, D., Bowen, J., & Goeree, R. (2009). A review of the cost of cardiovascular disease. *Can J Cardiol*, *25*(6), e195-e202
- Thandavarayan, R. A., Giridharan, V. V., Sari, F. R., Arumugam, S., Veeraveedu, P. T., Pandian, G. N., Palaniyandi, S. S., Ma, M., Suzuki, K., Gurusamy, N., & Watanabe, K. (2011). Depletion of 14-3-3 protein exacerbates cardiac oxidative stress, inflammation and remodeling process via modulation of MAPK/NF-kB signaling pathways after streptozotocin-induced diabetes mellitus. *Cell Physiol Biochem*, *28*(5), 911-922
- Thorson, J. A., Yu, L. W., Hsu, A. L., Shih, N. Y., Graves, P. R., Tanner, J. W., Allen, P. M., Piwnicka-Worms, H., & Shaw, A. S. (1998). 14-3-3 proteins are required for maintenance of Raf-1 phosphorylation and kinase activity. *Mol Cell Biol*, *18*(9), 5229-5238
- Tonks, N. K. (2003). PTP1B: from the sidelines to the front lines! *FEBS Lett*, *546*(1), 140-148
- Tonks, N. K. (2005). Redox redux: revisiting PTPs and the control of cell signaling. *Cell*, *121*(5), 667-670
- Tonks, N. K. (2006). Protein tyrosine phosphatases: from genes, to function, to disease. *Nat Rev Mol Cell Biol*, *7*(11), 833-846
- Tonks, N. K. (2013). Protein tyrosine phosphatases--from housekeeping enzymes to master regulators of signal transduction. *FEBS J*, *280*(2), 346-378
- Tonks, N. K., Diltz, C. D., & Fischer, E. H. (1988). Purification of the major protein-tyrosine-phosphatases of human placenta. *J Biol Chem*, *263*(14), 6722-6730
- Towne, V., Will, M., Oswald, B., & Zhao, Q. (2004). Complexities in horseradish peroxidase-catalyzed oxidation of dihydroxyphenoxazine derivatives: appropriate ranges for pH values and hydrogen peroxide concentrations in quantitative analysis. *Anal Biochem*, *334*(2), 290-296
- Ugi, S., Imamura, T., Ricketts, W., & Olefsky, J. M. (2002). Protein phosphatase 2A forms a molecular complex with Shc and regulates Shc tyrosine phosphorylation and downstream mitogenic signaling. *Mol Cell Biol*, *22*(7), 2375-2387
- Vivanco, I., & Sawyers, C. L. (2002). The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. *Nat Rev Cancer*, *2*(7), 489-501

- Walte, A., Ruben, K., Birner-Gruenberger, R., Preisinger, C., Bamberg-Lemper, S., Hilz, N., Bracher, F., & Becker, W. (2013). Mechanism of dual specificity kinase activity of DYRK1A. *FEBS J*, 280(18), 4495-4511
- Wang, Z. (2016). Transactivation of Epidermal Growth Factor Receptor by G Protein-Coupled Receptors: Recent Progress, Challenges and Future Research. *Int J Mol Sci*, 17(1)
- Wang, Z., & Cole, P. A. (2014). Catalytic Mechanisms and Regulation of Protein Kinases. *Methods enzymol*, 548, 1-21
- Wheeler-Jones, C. P. (2005). Cell signalling in the cardiovascular system: an overview. *Heart*, 91(10), 1366-1374
- Wilker, E., & Yaffe, M. B. (2004). 14-3-3 Proteins--a focus on cancer and human disease. *J Mol Cell Cardiol*, 37(3), 633-642
- Wilkins, B. J., & Molkenin, J. D. (2004). Calcium-calcineurin signaling in the regulation of cardiac hypertrophy. *Biochem Biophys Res Commun*, 322(4), 1178-1191
- Winterbourn, C. C. (1995). Toxicity of iron and hydrogen peroxide: the Fenton reaction. *Toxicol Lett*, 82-83, 969-974
- Wlodarchak, N., & Xing, Y. (2016). PP2A as a master regulator of the cell cycle. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 51(3), 162-184
- World Health Organization. (2009). *Global Health Risks: Mortality and Burden of Disease Attributable to Selected Major Risks*: World Health Organization.
- World Health Organization. (2014). Global status report on noncommunicable diseases 2014. 298
- Wu, K. L., Wu, C. A., Wu, C. W., Chan, S. H., Chang, A. Y., & Chan, J. Y. (2013). Redox-sensitive oxidation and phosphorylation of PTEN contribute to enhanced activation of PI3K/Akt signaling in rostral ventrolateral medulla and neurogenic hypertension in spontaneously hypertensive rats. *Antioxid Redox Signal*, 18(1), 36-50
- Xiao, B., Smerdon, S. J., Jones, D. H., Dodson, G. G., Soneji, Y., Aitken, A., & Gamblin, S. J. (1995). Structure of a 14-3-3 protein and implications for coordination of multiple signalling pathways. *Nature*, 376(6536), 188-191
- Xing, H., Zhang, S., Weinheimer, C., Kovacs, A., & Muslin, A. J. (2000). 14-3-3 proteins block apoptosis and differentially regulate MAPK cascades. *EMBO J*, 19(3), 349-358
- Xu, Y., Xing, Y., Chen, Y., Chao, Y., Lin, Z., Fan, E., Yu, J. W., Strack, S., Jeffrey, P. D., & Shi, Y. (2006). Structure of the protein phosphatase 2A holoenzyme. *Cell*, 127(6), 1239-1251
- Yaffe, M. B. (2002). How do 14-3-3 proteins work?-- Gatekeeper phosphorylation and the molecular anvil hypothesis. *FEBS Lett*, 513(1), 53-57
- Yang, J., Niu, T., Zhang, A., Mishra, A. K., Zhao, Z. J., & Zhou, G. W. (2001). Relation between the flexibility of the WPD loop and the activity of the catalytic domain of protein tyrosine phosphatase SHP-1. *J Cell Biochem*, 84(1), 47-55
- Yang, L., Dan, H. C., Sun, M., Liu, Q., Sun, X. M., Feldman, R. I., Hamilton, A. D., Polokoff, M., Nicosia, S. V., Herlyn, M., Sebt, S. M., & Cheng, J. Q. (2004). Akt/protein kinase B signaling inhibitor-2, a selective small molecule inhibitor of Akt signaling with antitumor activity in cancer cells overexpressing Akt. *Cancer Res*, 64(13), 4394-4399
- Yang, M., Haase, A. D., Huang, F.-K., Coulis, G., Rivera, K. D., Dickinson, B. C., Chang, C. J., Pappin, D. J., Neubert, T. A., Hannon, G. J., Boivin, B., & Tonks, N. K. (2014). Dephosphorylation of Tyrosine 393 in Argonaute 2 by Protein Tyrosine Phosphatase 1B

- Regulates Gene Silencing in Oncogenic RAS-Induced Senescence. *Mol Cell*, 55(5), 782-790
- Yin, Y., & Shen, W. H. (2008). PTEN: a new guardian of the genome. *Oncogene*, 27(41), 5443-5453
- Zabolotny, J. M., Bence-Hanulec, K. K., Stricker-Krongrad, A., Haj, F., Wang, Y., Minokoshi, Y., Kim, Y. B., Elmquist, J. K., Tartaglia, L. A., Kahn, B. B., & Neel, B. G. (2002). PTP1B regulates leptin signal transduction in vivo. *Dev Cell*, 2(4), 489-495
- Zhang, J., Zhang, F., & Niu, R. (2015). Functions of Shp2 in cancer. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 19(9), 2075-2083
- Zhang, S. H., Kobayashi, R., Graves, P. R., Piwnica-Worms, H., & Tonks, N. K. (1997). Serine Phosphorylation-dependent Association of the Band 4.1-related Protein-tyrosine Phosphatase PTPH1 with 14-3-3 Protein. *Journal of Biological Chemistry*, 272(43), 27281-27287
- Zhang, Z. Y., Walsh, A. B., Wu, L., McNamara, D. J., Dobrusin, E. M., & Miller, W. T. (1996). Determinants of substrate recognition in the protein-tyrosine phosphatase, PTP1. *J Biol Chem*, 271(10), 5386-5392
- Zhao, J., Meyerkord, C. L., Du, Y., Khuri, F. R., & Fu, H. (2011). 14-3-3 proteins as potential therapeutic targets. *Semin Cell Dev Biol*, 22(7), 705-712
- Zhu, S., Bjorge, J. D., & Fujita, D. J. (2007). PTP1B contributes to the oncogenic properties of colon cancer cells through Src activation. *Cancer Res*, 67(21), 10129-10137
- Zinker, B. A., Rondinone, C. M., Trevillyan, J. M., Gum, R. J., Clampit, J. E., Waring, J. F., Xie, N., Wilcox, D., Jacobson, P., Frost, L., Kroeger, P. E., Reilly, R. M., Koterski, S., Opgenorth, T. J., Ulrich, R. G., Crosby, S., Butler, M., Murray, S. F., McKay, R. A., Bhanot, S., Monia, B. P., & Jirousek, M. R. (2002). PTP1B antisense oligonucleotide lowers PTP1B protein, normalizes blood glucose, and improves insulin sensitivity in diabetic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(17), 11357-11362