

2m 11.2821.6

Université de Montréal

L'action insulino-mimétique du sulfate de vanadyle sur la cascade de  
signalisation de l'insuline

par

Jean-François Théberge

Département de Médecine

Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures  
en vue de l'obtention du grade de  
Maître ès sciences (M.Sc.)  
en sciences biomédicales

Juin 2000

©Jean-François Théberge, 2000



Université de Montréal

L'acton institutionnelle du service de santé de la ville de Montréal  
évaluation de l'impact

W  
4  
258  
2000  
N. 111

par

Jean-François Théberge

Département de Médecine

Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures  
en vue de l'obtention du grade de  
Maître ès sciences (M.Sc.)  
en sciences biomédicales

Année 2015

Jean-François Théberge, 2015



## PAGE D'IDENTIFICATION DU JURY

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé:

L'action insulino-mimétique du sulfate de vanadyle sur la cascade de  
signalisation de l'insuline

présenté par :

Jean-François Théberge

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes:

Présente du jury:	Dr. Johanne Tremblay
Membre du jury:	Dr. Angelino Calderone
Directeur de recherche:	Dr. Ashok K. Srivastava

Mémoire accepté le:

## SOMMAIRE

L'action anti-diabétique et les nombreux effets physiologiques insulino-mimétiques des sels de vanadium ont été démontrés à maintes reprises dans la littérature. Ces effets proviennent en partie de leur pouvoir d'inhiber les phosphatases de tyrosine (PTPases). Le mécanisme d'action par lequel ces sels induisent leurs effets insulino-mimétiques n'est pas bien caractérisé. Notre but est d'approfondir le mécanisme d'action du sulfate de vanadyle (VS) dans la cascade de signalisation de l'insuline. Nous avons déjà démontré que le VS peut activer plusieurs composants de la cascade de signalisation de l'insuline comme les «Extracellular signal-regulated kinases 1/2» (ERK 1/2 ou ERKs), la phosphatidylinositol-3-kinase (PI3-k) et deux kinases ribosomales p90<sup>rsk</sup> et p70<sup>s6k</sup> et ce, de façon indépendante au récepteur à l'insuline.

La présente étude a pour but de cerner le rôle de la PI3-k et de ras dans la signalisation induite par le VS en ce qui a trait à l'activation de tous les composants de la voie des ERKs. Qui plus est, nous avons étudié temporellement l'action du VS et de l'insuline sur les enzymes clés de la cascade de signalisation de l'insuline. Nous avons également étudié la modulation temporelle de l'action de l'insuline par le VS sur ces mêmes enzymes. Toutes nos études ont été effectuées dans les cellules d'ovaires d'hamsters chinois surexprimant le récepteur humain à l'insuline (CHO-HIR).

Nous avons démontré que la wortmannin, un inhibiteur de la PI3-k, bloque l'activation induite par le VS au niveau de ras, raf-1, des kinases des ERKs (MEKs) et des ERKs. Nous avons aussi étudié le rôle de ras en démontrant l'interaction physique entre ras et PI3-k en réponse au VS. Nous avons également observé qu'un inhibiteur de la farnésylation de ras bloque l'activation induite par le VS au niveau des ERKs. Ainsi, nos résultats suggèrent que l'action du VS sur la cascade des ERKs nécessite l'activation de la PI3-k et emprunte la voie de ras. Cette hypothèse fut confirmée en démontrant que le VS induit la même cinétique biphasique pour la PI3-k et les ERKs. Par ailleurs, nous avons observé que

l'insuline induisait une activation rapide et transitoire de la PI3-k et des ERKs. Fait intéressant, le VS bloque la désactivation de la PI3-k induite normalement par l'insuline et il en est de même pour les ERKs. Ainsi, nous avons démontré que le VS peut prolonger l'action de l'insuline au niveau de la PI3-k et des ERKs.

Cette étude nous a permis de mettre en évidence le rôle de la PI3-k et de ras dans la signalisation insulino-mimétique induite par le VS. De plus, nous avons approfondi les mécanismes d'action du VS, dans le temps, au niveau de la cascade de signalisation de l'insuline. Toutefois, l'identification des PTPases potentiellement impliquées dans le mode d'action du VS est inconnue mais s'avère être très importante.

## TABLE DES MATIÈRES

Sommaire .....	iii
Liste des figures .....	viii
Listes des abréviations et définitions .....	ix
Remerciements .....	xiii
<b>PREMIÈRE PARTIE: REVUE DE LA LITTÉRATURE .....</b>	<b>1</b>
<b>CHAPITRE 1. LE VANADIUM .....</b>	<b>2</b>
1.1 Généralités .....	3
1.2 Historique .....	3
1.3 Diabète.....	4
1.4 L'action anti-diabétique du vanadium.....	5
1.5 L'action du vanadium sur la cascade de signalisation de l'insuline..	6
<b>CHAPITRE 2. LA CASCADE DE SIGNALISATION DE L'INSULINE .....</b>	<b>7</b>
2.1 L'origine de la signalisation .....	8
2.2 Le récepteur à l'insuline .....	8
2.3 Les substrats du récepteur à l'insuline .....	9
2.4 La voie de la phosphatidyl inositol-3 kinase .....	11
2.4.1 Ses implications .....	11
2.4.2 La régulation de son activité .....	12
2.4.3 Ses substrats .....	14
2.5 La voie des MAPK .....	17
2.5.1 Généralités .....	17
2.5.2 Ras .....	18
2.5.3 Raf-1 .....	21
2.5.4 MEK 1/2 .....	21
2.5.5 ERK 1/2 .....	22

<b>CHAPITRE 3. LA RÉGULATION DE LA CASCADE DE SIGNALISATION DE L'INSULINE</b> .....	25
3.1 Le rôle de la phosphatidyl inositol-3 kinase au niveau de la voie des ERKs .....	26
3.2 Le rôle des kinases de sérine/thréonine .....	27
3.3 Le rôle des phosphatases de sérine/thréonine .....	28
3.4 Le rôle des phosphatases de tyrosine .....	31
3.4.1 Les phosphatases de tyrosine classiques .....	31
3.4.2 Les phosphatases à double spécificité .....	33
3.4.3 L'importance des phosphatases de tyrosine .....	34
 <b>DEUXIÈME PARTIE: PRÉSENTATION DES TRAVAUX</b> .....	36
 <b>MATÉRIELS ET MÉTHODES</b> .....	37
 <b>CHAPITRE 4. RÔLE DE LA PHOSPHATIDYL INOSITOL-3 KINASE DANS L'ACTION INSULINOMIMÉTIQUE DU SULFATE DE VANADYLE</b> .....	42
4.1 L'effet de la wortmannin sur l'activation de ras par le sulfate de vanadyle <sup>†</sup> .....	43
4.2 L'effet de la wortmannin sur l'activation de raf-1 et des MEKs par le sulfate de vanadyle <sup>†</sup> .....	45
4.3 L'effet de la wortmannin et du LY294002 sur l'activation des ERKs par le sulfate de vanadyle <sup>†</sup> .....	47
4.4 L'activation de la phosphatidyl inositol-3 kinase par le sulfate de vanadyle <sup>†</sup> .....	49
4.5 L'effet d'un inhibiteur de la farnésylation de ras sur l'activation des ERKs par le sulfate de vanadyle <sup>†</sup> .....	51

## **CHAPITRE 5. L'ACTION INSULINOMIMÉTIQUE DU SULFATE DE VANADYLE SUR LA CASCADE DE SIGNALISATION**

<b>DE L'INSULINE</b> .....	53
5.1 La signalisation de l'insuline .....	54
5.2 La signalisation du sulfate de vanadyle .....	55
5.3 La modulation de la signalisation de l'insuline par le sulfate de vanadyle .....	58
5.4 La phosphorylation de la protéine kinase B .....	60

## **CHAPITRE 6. DISCUSSION ET CONCLUSIONS**

<b>GÉNÉRALES</b> .....	61
6.1 Le rôle de la phosphatidyl inositol 3-kinase dans la signalisation du sulfate de vanadyle .....	62
6.2 La signalisation de l'insuline .....	64
6.3 La signalisation du sulfate de vanadyle .....	67
6.4 La modulation de la signalisation de l'insuline par le sulfate de vanadyle .....	68
6.5 La phosphorylation de la protéine kinase B .....	69
6.6 Conclusions et perspectives .....	70

<b>BIBLIOGRAPHIE</b> .....	71
----------------------------	----



## LISTE DES FIGURES

### Première partie: Revue de la littérature.

Figure 2.1 Activation de la cascade de signalisation de l'insuline.....	10
Figure 2.2 Mécanisme d'activation de la protéine kinase B.....	16
Figure 2.3 La régulation de l'activation de ras.....	20
Figure 3.1 Le rôle potentiel de la phosphatidyl inositol 3-kinase dans la signalisation de l'insuline et du sulfate de vanadyle.....	30

### Deuxième partie: Présentation des travaux.

Figure 4.1 L'effet de la wortmannin sur l'activation de ras par le sulfate de vanadyle.† .....	44
Figure 4.2 L'effet de la wortmannin sur l'activation de raf-1 et des MEKs par le sulfate de vanadyle.† .....	46
Figure 4.3 L'effet de la wortmannin et du LY294002 sur l'activation des ERKs par le sulfate de vanadyle.† .....	48
Figure 4.4 L'activation de la phosphatidyl inositol-3 kinase par le sulfate de vanadyle et l'insuline.† .....	50
Figure 4.5 L'effet d'un inhibiteur de la farnésylation de ras sur l'activation des ERKs par le sulfate de vanadyle.† .....	52
Figure 5.1 La signalisation de l'insuline .....	56
Figure 5.2 La signalisation du sulfate de vanadyle .....	57
Figure 5.3 La modulation de la signalisation de l'insuline par le sulfate de vanadyle .....	59
Figure 5.4 La phosphorylation de la protéine kinase B .....	60

## LISTES DES ABRÉVIATIONS ET DÉFINITIONS

14-3-3 $\beta$	Protéine liant raf-1 et IRS-1
ATP	Adénosine 5'-triphosphate
ATP ( $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ )	ATP marqué par le $^{32}\text{P}$ sur le phosphate $\gamma$
B581	Inhibiteur de la farnésylation
C	Contrôle cellulaire du niveau basal
CAAX	Motif conservé de ras reconnu par la FTase
Cellule CHO-HIR	Cellule d'ovaire d'hamster chinois surexprimant le récepteur humain à l'insuline
C-fos	Facteur de transcription
c-Myc	Facteur de transcription
Crk	Kinase de tyrosine
Csk	Kinase de tyrosine
Domaine PTB	Partie d'une protéine se liant à une séquence d'acides aminés spécifiques, comprenant une tyrosine phosphorylée, que l'on retrouve dans le récepteur à l'insuline
Domaine PTP	Domaine catalytique des phosphatases de tyrosine
DMSO	Diméthyl sulfoxyde
DSPase	Phosphatase à double spécificité
DTT	Dithiothreitol
ECL	Système de détection par chemiluminescence
EGF	Facteur de croissance épithélial
EGTA	Acide éthylènebis(oxoethylenitrilo)tetraacétique
Elk 1	Facteur de transcription
ERK 1/2 (ERKs)	Kinases régulées par des signaux extracellulaires "Extracellular signal-regulated kinases 1/2"
Ets 1	Facteur de transcription
FAK	Kinase de l'adhésion focale
Fyn	Kinase de tyrosine

Ftase	Transférase de farnésyle
Gab-1	Substrat du récepteur à l'insuline
GAP	Protéine activatrice de GTPase
GEF	Facteur d'échange de guanine
Grb-2	Protéine adaptatrice constitutivement liée à sos "Growth factor Receptor-bound protein-2"
GSK-3	Kinase-3 de la Glycogène synthétase "Glycogen Synthases Kinase-3"
GST-RBD	La protéine de fusion glutathione S-transférase liant le domaine de liason à ras de raf-1
GTP	Guanine triphosphate
GTPase	Phosphatase de GTP
HEPES	Acide N-(2-hydroxyethyl)piperazine-N'-2-ethanesulfonique
IB	Immunobuvardage
(I/V)HcxAGxx	
R(S/T)G	Séquence signature des PTPases (Isoleucine/Valine, Histidine, Cystéine, inconnu, Alanine, Glutamate, inconnu, inconnu, arginine, Sérine/thréonine, Glutamate)
IGF-1	Facteur de croissance "Insulin-like Growth Factor"
IP	Immunoprécipitation
IR	Récepteur à l'insuline
IRS	Substrat du récepteur à l'insuline
LAR	Phosphatase de tyrosine associée au récepteur à l'insuline
LY294002	Inhibiteur synthétique de la PI3-k
MAP	Protéine associée aux microtubules
MAPK	Kinase activées par des mitogènes désignant les ERK 1/2
MBP	Protéine basique de myéline
MEK 1/2 (MEKs)	Kinases à double spécificité pouvant activer les ERK 1/2
MEKK	Kinase des MEKs comme raf-1
MKP	Phosphatase spécifique aux MAPK

mTOR	Mammalian Target of Rapamycin
Nck	Protéine adaptatrice se liant à IRS-1
NGF	Facteur de croissance neuronal
p62 <sup>dok</sup>	Substrat du récepteur à l'insuline
p70 <sup>s6k</sup>	Kinase ribosomale
p85, p55, p50	Sous-unités régulatrices de la PI3-k
p90 <sup>RSK</sup>	Kinase de sérine et thréonine, activée par les ERK 1/2
p110	Sous-unité catalytique de la PI3-k
PD98059	Inhibiteur synthétique des MEK 1/2
PDK-1	Kinase de thréonine membranaire "Phosphatidylinositol-3 dependent Kinase-1"
PH	Domaine "Pleckstrin Homology" reconnaît les têtes chargées des phosphatidyl inositol spécifiques.
PI3-k	Phosphatidyl inositol-3 kinase
PIP	Phosphatidyl inositol phosphate
PIP <sub>2</sub> , PIP <sub>3</sub>	Produits lipidiques de la PI3-k
PKA	Protéine kinase A
PKB	Protéine kinase B
PKC	Protéine kinase C
PP2A	Phosphatase de sérine et thréonine
PMSF	Phénylméthylsulfonyl fluoride
PTEN	Phosphatase des produits de la PI3-k
PTPase	Phosphatase de tyrosine
PTP-1B	Phosphatase de tyrosine associée au récepteur à l'insuline
PXSP	Motif consensus de phosphorylation des MAPK (proline, inconnu, sérine, proline)
pY	Tyrosine phosphorylée
Pyst1	MKP transcrit après une longue période de temps
Raf-1	Kinase de sérine pouvant activer les MEK 1/2
Ras	Petite GTPase pouvant activer raf-1
RBD	Domaine de liaison à ras de raf-1

RPTPase	Phosphatase de tyrosine membranaire
RSXS	Motif consensus reconnu par la protéine 14-3-3 "Arginine, Sérine, inconnu, Sérine"
Sap 1a	Facteur de transcription
Shc	Substrat du récepteur à l'insuline
SDS	Dodécyl sulfate de sodium
SH2	Partie d'une protéine se liant à un site spécifique comprenant une tyrosine phosphorylée "Src Homology 2"
SHIP	Phosphatase spécifique des PIP <sub>3</sub> et PIP <sub>4</sub> "SH2-containing inositol 5-phosphatase"
SHP-2 (SHPTP2, PTP-1D, Syp)	Phosphatase de tyrosine liant IRS-1
Sos	Facteur d'échange de nucléotide pour ras "son of sevenless"
STE5	Protéine d'échafaudage de levure
Tal	Facteur de transcription
Tau	Facteur de transcription
TNF $\alpha$	Facteur de nécrose tumorale $\alpha$
TZD	Thiazolidinediones, sensibilisateurs de l'insuline
VHR	Phosphatase de tyrosine spécifique aux MAPK
VS	Sulfate de vanadyle
YMXM	Séquence d'acides aminés spécifique reconnue par la PI3-k (tyrosine, méthionine, inconnu, méthionine)
YXNX	Séquence d'acides aminés spécifique reconnue par Grb-2 (tyrosine, inconnu, asparagine, inconnu)
YASI et YIDL	Séquence d'acides aminés spécifique reconnue par SHP-2 (tyrosine alanine, sérine, isoleucine et tyrosine, isoleucine, acide aspartique, leucine)

## REMERCIEMENTS

J'aimerais remercier mon directeur, le Docteur Ashok K. Srivastava pour sa grande considération à mon égard ainsi que pour sa grande disponibilité. Il a été un directeur digne de ce nom. J'aimerais également remercier le Docteur Lise Codère pour son support technique. Je remercie le Docteur Sanjay K. Pandey, Josée Bourque, Carmen Sabau, Annie Tardif, Antoine Blanc et Nathalie Julien pour leur encadrement scientifique. Je remercie le Docteur Jean-Louis Chiasson et son équipe qui m'ont fait connaître le côté clinique de la recherche.

À Nathaly...

## **PREMIÈRE PARTIE: REVUE DE LA LITTÉRATURE**



## **CHAPITRE 1. LE VANADIUM**

## 1.1 Généralités

Le vanadium est un élément de transition du groupe V que l'on retrouve à l'état de trace dans la plupart des cellules de mammifères. Le vanadium est impliqué dans un grand nombre de phénomènes biologiques comme la prévention des caries dentaires, le traitement des infections, le diabète, l'athérosclérose et l'anémie (Nechay 1986). Il joue également un rôle dans le métabolisme des lipides, des amines biogéniques et au niveau de la fixation de l'azote par les plantes (Barceloux 1999). Le vanadium pourrait même jouer un rôle dans certains désordres affectifs. On le retrouve également dans plusieurs aliments de base. Le lait écrémé, le homard, l'huile végétale et les céréales sont des aliments riches en vanadium. La prise quotidienne de vanadium chez les humains varie entre 10 µg et 2 mg selon sa teneur dans l'air, l'eau et la nourriture. Jusqu'à maintenant, il n'existe pas d'évidences montrant un caractère essentiel du vanadate chez l'humain (Brichard 1990, Ramanadham 1989).

## 1.2 Historique

Le vanadium fut découvert en 1801 par Del Rio qui le confondait avec un genre de chrome. Il fut redécouvert en 1830 par le chimiste suédois Nils Sefstrom qui le considéra comme un nouvel élément. C'est à la fin du 19<sup>e</sup> siècle que le vanadium fut reconnu pour son action thérapeutique dans le cas du diabète et dans nombreuses infections (Meyerovitch 1987). En 1899, il fut démontré que les sels de vanadium administrés à des patients diabétiques provoquaient une baisse du taux de glucose urinaire. En 1979, Tolman fut le premier à démontrer les effets insulino-mimétiques du vanadium *in vitro* tandis qu'en 1985, Heyliger publia des résultats similaires *in vivo*. Depuis, de nombreuses études ont démontré les actions anti-diabétiques du vanadate chez l'humain et l'animal, ainsi que ses actions insulino-mimétiques dans de nombreuses lignées cellulaires (Kolter 1997, Poucheret 1998, Meyerovitch 1991, Sekar 1996).

### 1.3 Diabète

Le diabète mellitus est une des maladies métaboliques les plus répandues affectant plus de 100 millions de personnes en occident. Le diabète est l'une des principales causes de la cécité, de l'insuffisance rénale et de nombreuses amputations chez les adultes. De plus, le diabète représente un facteur de risque majeur de maladie cardio-vasculaire. Les études épidémiologiques ont démontré que le diabète provient d'une hérédité polygénique et d'une forte influence de l'environnement comme le régime alimentaire, l'âge, le niveau d'activité physique et l'obésité (Kahn 1998).

Il existe deux sortes de diabète, le diabète de type 1 (insulino-dépendant) et le diabète de type 2 (insulino-indépendant). Dans ces deux cas, on observe une augmentation de la glycémie des patients. Le diabète de type 1 survient surtout chez les jeunes et provient d'une destruction autoimmune des cellules  $\beta$  du pancréas. Cette destruction provoque une déficience de la sécrétion de l'insuline, induisant une hyperglycémie (Reaven 1995). Le diabète de type 2 représente 90% des diabétiques et se développe principalement avec l'âge. Cette pathologie s'amorce généralement par une résistance à l'action de l'insuline au niveau du muscle, des tissus adipeux et du foie (Cheatham 1995, Kulkarni 1999). Il a été suggéré que la résistance à l'insuline précède la maladie et est compensée par une augmentation de la sécrétion d'insuline. Le diabète de type 2 apparaîtrait lorsque le pancréas n'est plus capable de sécréter assez d'insuline pour compenser la résistance à l'insuline (Bruning 1998, Kahn 1998, Reaven 1995). Malgré les études menées jusqu'à ce jour, aucune hypothèse ne permet d'expliquer avec précision ces défauts.

#### **Le rôle de l'insuline dans le diabète**

L'insuline est une hormone impliquée dans le transport du glucose, la synthèse du glycogène, des protéines et des triglycérides. Elle inhibe la lipolyse ainsi que la néoglucogenèse hépatique. Elle est reconnue comme l'hormone anabolique

par excellence. L'insuline est aussi un facteur de croissance puisqu'elle stimule la prolifération cellulaire et inhibe l'apoptose cellulaire.

Actuellement, la thérapie par l'insuline reste la meilleure façon de réduire les complications reliées au diabète de type 1 (Rabasa-Lhoret 1997). Cependant, ce traitement est souvent limité par l'apparition de la résistance à l'insuline. Pour ce qui est des diabétiques de type 2, il existe des thérapies à base d'hypoglycémifiants oraux. Cependant, avec le temps, les patients deviennent souvent insensibles à ces traitements. Vers la fin de leur maladie, les patients atteints du diabète de type 2 ont souvent recours à une thérapie à l'insuline. Cette détérioration progressive du métabolisme du glucose est causée, en partie, par l'insensibilité à l'insuline (Badmaev 1999, Barceloux 1999).

Par conséquent, la recherche est orientée vers des agents qui pourraient augmenter la sensibilité à l'insuline et ainsi améliorer la santé des patients diabétiques de type 1 et 2. C'est ainsi que les sels de vanadium entrent en jeu.

#### **1.4 L'action anti-diabétique du vanadium**

Le caractère intéressant des sels de vanadium est leur action anti-diabétique. En effet, des études récentes ont démontré qu'ils peuvent normaliser l'hyperglycémie chez des modèles animaux diabétiques et des patients diabétiques, tous deux souffrant du diabète du type 1 et 2 (Cohen 1995). En fait, le vanadium possède des propriétés insulino-mimétiques intéressantes qui peuvent être exploitées pour la recherche sur le diabète. Plus précisément, des études ont démontré que leurs effets se font au niveau de la stimulation du transport du glucose, de la synthèse du glycogène et de la lipogénèse, de même que l'inhibition de la lipolyse et de la gluconéogénèse (Poucheret 1998). Contrairement à l'insuline, les sels de vanadium induisent leurs effets en l'absence d'activation du récepteur à l'insuline, sauf dans les adipocytes (Sekar 1996). Plusieurs études suggèrent que ces sels induisent leurs effets par leur pouvoir d'inhiber les PTPases. Les sels de vanadium représentent une approche

complémentaire très prometteuse pour le traitement de la résistance à l'insuline et/ou de la déficience en insuline. Ils représentent aussi un outil très puissant pour l'étude des mécanismes moléculaires du diabète.

### **1.5 L'action du vanadium sur la cascade de signalisation de l'insuline**

Nos études antérieures ont démontré que les différents sels de vanadium peuvent activer la plupart des composants de la cascade de signalisation de l'insuline. En effet, ils augmentent la phosphorylation des tyrosines du "Insulin Receptor Substrate-1" (IRS-1), l'activité de la PI3-k et des ERKs (D'onofrio 1994, Pandey 1995, 1998). De plus, nous avons démontré que ces effets sont indépendants de l'activation du récepteur à l'insuline. Nous avons établi le lien entre l'activation de ces composants par le VS et la synthèse du glycogène (Pandey 1998). Ces résultats ont déjà été reproduits à maintes reprises dans plusieurs lignées cellulaires et toutes ces études sont unanimes sur le fait que les sels de vanadium miment les effets de l'insuline. Aujourd'hui, le véritable défi consiste à clarifier le mécanisme d'action de ces sels. Il est très complexe d'étudier les effets d'un composé sur plusieurs composants d'une même cascade de signalisation puisque ceux-ci sont tous reliés. Il est difficile de savoir si l'effet observé est causé par une stimulation directe ou à un effet indirect découlant de la cascade. Il est donc primordial de très bien connaître cette cascade de signalisation de l'insuline.

**CHAPITRE 2. LA CASCADE DE SIGNALISATION DE  
L'INSULINE**

## 2.1 L'origine de la signalisation

Au cours de l'évolution, les cellules primaires se sont prémunies d'un noyau renfermant leur matériel génétique. Ces cellules ont pu ainsi protéger leurs gènes contre l'environnement externe, les nucléases ou certains mutagènes. Cependant, cette protection vitale a nécessité la mise en branle de tout un système de signalisation biochimique permettant au noyau non seulement de recevoir l'information de son environnement extracellulaire, mais également de réagir en conséquence. Ce réseau est constitué de récepteurs, de complexes protéiques, d'enzymes, de molécules adaptatrices et de seconds messagers. Cette machinerie très élaborée est nécessaire pour diriger le flux d'information provenant de l'extérieur de la cellule, via le cytoplasme, vers le noyau (Heimbrooke 1998, Hill 1995). Cette signalisation fait souvent défaut lors de graves maladies ou de désordres métaboliques. Dans le cadre de l'étude d'une maladie comme le diabète, l'approfondissement des connaissances sur la signalisation engendrée par l'insuline est crucial pour le développement de meilleures stratégies thérapeutiques. Il est donc primordial de s'attarder à la régulation d'une telle cascade mais tout d'abord, il est bon d'observer chacun de ses constituants majeurs.

## 2.2 Le récepteur à l'insuline

L'insuline provoque ses effets métaboliques et mitogéniques par sa liaison à son récepteur membranaire (Cheatham 1995). Le récepteur à l'insuline appartient à la grande famille des récepteurs de facteur de croissance possédant une activité intrinsèque de kinase de tyrosine. Le récepteur à l'insuline est un hétérotétramère glycosylé, composé de deux sous-unités  $\alpha$  extracellulaires et de deux sous-unités  $\beta$  cytoplasmiques. Le signal provient de la liaison de l'insuline à une sous-unité  $\alpha$  induisant un changement de conformation du récepteur. Ce changement de conformation permet l'activation d'une kinase de tyrosine située sur une sous-unité  $\beta$  engendrant l'autophosphorylation de ces tyrosines (figure 2.1; page 10). La phosphorylation de certains résidus tyrosine (pY) est cruciale pour l'obtention de

l'activité maximale du domaine kinase du récepteur. Suite à son activation, le récepteur à l'insuline est internalisé dans des vésicules endosomales (Shepherd 1998). Cette internalisation n'est pas nécessaire à l'activité mais plutôt au ciblage du récepteur. Elle sert aussi à la régulation à la baisse de l'activité du récepteur (Di Guglielmo 1998). En effet, l'internalisation du récepteur à l'insuline permet l'élimination de l'insuline et l'initiation de sa déphosphorylation (Goldstein 1998).

### 2.3 Les substrats du récepteur à l'insuline

Une fois activé, le récepteur à l'insuline phosphoryle plusieurs substrats sur des résidus tyrosines. À ce jour, il y a neuf substrats bien caractérisés dont les IRS-1, IRS-2, IRS-3, IRS-4, lesquels sont considérés comme étant les plus spécifiques (Fantin 1999). On y retrouve également Gab-1, les trois isoformes de Shc et la p62<sup>dok</sup> (Myers 1998). Tous ces substrats sont considérés comme étant des protéines d'ancrage qui, lorsque phosphorylés, peuvent recruter plusieurs enzymes ou protéines adaptatrices (figure 2.1; page 10). IRS-1 fut le premier substrat découvert et le plus étudié mais c'est la délétion d'IRS-2 qui cause le diabète chez la souris (Di Guglielmo 1998, Withers 1998).

La phosphorylation des substrats du récepteur sur des tyrosines crée des sites pouvant être reconnus par plusieurs protéines. En effet, une multitude de protéines adaptatrices et d'enzymes se lient aux IRS phosphorylés par leur domaine "Src Homology 2" (SH2). Chaque domaine SH2 reconnaît un site spécifique comprenant une tyrosine phosphorylée suivie de quelques acides aminés spécifiques. Chez les IRS, on dénombre trois sites très bien conservés. Il y a plusieurs motifs YMXM qui lient la sous-unité régulatrice des PI3-k, p85. Un autre motif, YXNX, lie la «Growth Factor Receptor-bound protein-2» (Grb-2) et finalement, il y a une paire de motifs en C-terminale, YIDL et YASI, lesquels sont responsables de la liaison d'une phosphatase de tyrosine, SHP-2 (figure 2.1; page 10) (Myers 1998). La littérature fait état d'au moins une douzaine de ces protéines. Certaines d'entre elles sont des



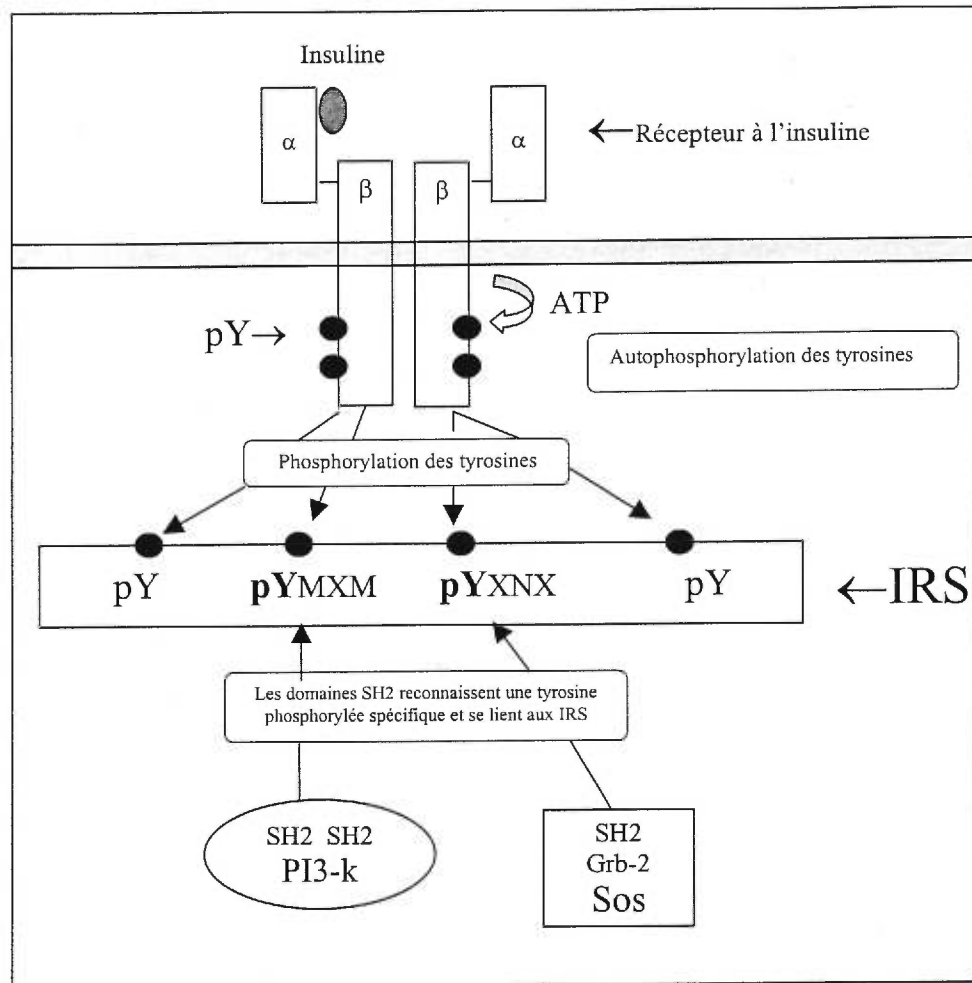


Figure 2.1. Activation de la cascade de signalisation de l'insuline (inspiré de Virkamäki 1999).

enzymes comme les kinases de tyrosine Fyn et Csk et la «SH2-containing inositol 5-phosphatase» (SHIP) et SHP-2. Certaines autres sont des protéines adaptatrices comme Grb-2, Crk et Nck (Ogawa 1998, Wunderlich 1998, Virkamäki 1999). De ces points de ralliement émergent plusieurs voies de signalisation. Les plus étudiées sont la voie de la PI3-k de même que celle des ERKs (Cheatham 1995, Welsh 1998).

## 2.4 La voie de la phosphatidylinositol-3 kinase

### 2.4.1 Ses implications

La PI3-k est une enzyme-clé impliquée dans plusieurs voies de signalisation. Une fois activée, la PI3-k phosphoryle, à la position 3, des phosphatidyl inositols devenant des seconds messagers: Le phosphatidyl inositol 3,4-bisphosphate (PI(3,4)P<sub>2</sub> ou PIP<sub>2</sub>) et le phosphatidyl inositol 3,4,5-trisphosphate (PI(3,4,5)P<sub>3</sub> ou PIP<sub>3</sub>) (Fruman 1998). La PI3-k possède également une activité kinase de sérine et thréonine. Cependant, aucun substrat n'a été identifié jusqu'à présent (Bondeva 1998, Hunter 1995). La PI3-k est très importante pour la transmission des signaux métaboliques, mitogéniques et anti-apoptotiques induits par l'insuline. La PI3-k se situe littéralement au carrefour d'une panoplie de cascades de signalisation impliquant notamment la stimulation de la synthèse du glycogène, la synthèse des acides gras, la synthèse des protéines, le transport du glucose et l'inhibition de la lipolyse. Elle est aussi impliquée dans la transcription de gènes, le transport vésiculaire, le réarrangement du cytosquelette et l'inhibition de l'apoptose (Toker 1997).

#### Sa constitution

Les PI3-k sont séparées en trois classes selon leur spécificité de substrat *in vitro*. La classe I se compose d'hétérodimères formés d'une sous-unité régulatrice (50-100 kDa) et d'une sous-unité catalytique (110-120 kDa). La classe I phosphoryle le PI, le PI4-P et le PI(4,5)P<sub>2</sub>. Les PI3-k de classe I sont divisées en deux groupes selon leur sous-unité régulatrice. Les PI3-k de classe IA s'associent à une p85 et sont

dirigées vers des motifs phosphorylés sur des tyrosines, tandis que les PI3-k de classe IB (PI3-k- $\gamma$ ) interagissent avec des protéines G trimériques ou la protéine p101. La classe II se caractérise par un domaine C-terminal "C2 homology" et une spécificité de substrat se limitant aux PI et PI4-P. Pour cette classe, aucune sous-unité régulatrice n'a été identifiée et leur mécanisme d'activation n'est pas bien connu. Les PI3-k de classe III sont homologues à une protéine vasculaire bactérienne Vps34p et phosphorylent uniquement le PI (Wymann 1998). Nous nous intéresserons surtout à la classe IA des PI3-k puisque celle-ci est impliquée dans la cascade de signalisation de l'insuline.

Le mécanisme d'activation des PI3-k de classe IA dépend de la sous-unité régulatrice qui lie certaines tyrosines phosphorylées des IRS par ses domaines SH2. Cette liaison entraîne l'activation de la sous-unité catalytique, p110. À ce jour, on a répertorié au moins huit isoformes de la sous-unité régulatrice. Six d'entre-eux proviennent d'un épissage alternatif du gène p85 $\alpha$ . Ils sont p85 $\alpha$ , p55 $\alpha$  (AS53) et p50 $\alpha$ ; chacun d'eux se retrouvant avec ou sans insert, alors que p85 $\beta$  et p55<sup>PIK</sup> proviennent de gènes différents (Inukai 1997, Ogawa 1998).

En réponse à l'insuline, chacune de ces sous-unités régulatrices peut s'associer aux IRS et activer la PI3-k. Ceci permet un ciblage de l'enzyme dans différents compartiments cellulaires. D'ailleurs, il est possible que chaque isoforme soit ciblé à un compartiment cellulaire spécifique. Des études ont déjà démontré la translocation de l'enzyme, induite par l'insuline, du cytoplasme aux membranes intracellulaires (Inoue 1998). Puisque les vésicules intracellulaires représentent une surface membranaire beaucoup plus grande que la membrane plasmique, elles offrent un plus grand champ d'action à la PI3-k (Virkamäki 1999). Ainsi, sa localisation cellulaire et son affinité pour les substrats du récepteur à l'insuline jouent un rôle déterminant dans la spécificité de la réponse (Inukai 1997).

### **Ses inhibiteurs**

La découverte de deux inhibiteurs spécifiques de la PI3-k, la wortmannin et le LY294002, a été très utile pour caractériser son rôle dans la cascade de signalisation de l'insuline. La wortmannin est un métabolite provenant d'un champignon. Elle inhibe la PI3-k de façon irréversible (Wymann 1996). Le LY294002 inhibe la PI3-k de façon différente en compétitionnant pour le site liant l'adénosine triphosphate (ATP) (Vlahos 1994).

### **2.4.2 La régulation de son activité**

Malgré sa grande diversité d'action, peu de choses sont connues sur la régulation exacte de l'activité de la PI3-k. Même s'il est bien connu qu'elle s'active en interagissant avec les IRS-1 phosphorylés, il reste beaucoup à savoir en ce qui a trait à sa régulation à la baisse. Cette régulation peut être causée par tous les mécanismes s'opposant à l'interaction de la PI3-k avec IRS-1. Il a été démontré que les PIP<sub>3</sub> et PIP<sub>2</sub> peuvent interférer avec cette interaction (Rameh 1995). De plus, de nombreuses kinases de sérine/thréonine activées par l'insuline (la caséine kinase II, la "Glycogen Synthase kinase-3" (GSK-3), les ERKs et la PI3-k) peuvent phosphoryler IRS-1 sur des résidus sérine et ainsi changer sa conformation. Il a été suggéré que ce changement de conformation pourrait être à l'origine de la résistance à l'insuline. En mettant IRS-1 hors fonction, il y a

inhibition de toute la signalisation émergeant de cette protéine, dont la voie de la PI3-k (Chin 1994, Li 1999, Qiao 1999).

Aussi, la capacité de l'insuline à activer la PI3-k peut être inhibée par plusieurs agents dont les phorbols esters, le facteur  $\alpha$  de la nécrose tumorale (TNF $\alpha$ ) et l'acide okadaïque. Cette inhibition est présumée agir, elle aussi, via la phosphorylation des sérines et thréonines des IRS. Il y a au moins quatre sérines d'IRS-1 (sérine 612, 632, 662 et 731) comprises dans les motifs consensus (PXSP) de phosphorylation des ERKs (Shepherd 1998). Ces sérines sont toutes à proximité des sites de liaison de la PI3-k (YMxM). La phosphorylation de ces résidus par les ERKs pourrait ainsi interférer avec la liaison de la PI3-k. Dans la plupart des cas, la PI3-k et les ERKs sont activées en parallèle, ceci pourrait constituer un mode d'inhibition rétroactif de la PI3-k.

De plus, la phosphorylation de certaines sérines d'IRS-1 permet sa liaison avec la protéine 14-3-3  $\beta$ . Cette interaction diminue l'activité de la PI3-k associée avec IRS-1 (Kosaki 1998). D'ailleurs, les motifs consensus sur lesquels la protéine 14-3-3  $\beta$  se lie (RSXS) sont également des motifs consensus de phosphorylation de la part de la protéine kinase B (PKB) et la protéine kinase C (PKC). De plus, il a été démontré que PKB et PKC $\xi$  peuvent phosphoryler IRS-1 *in vivo*. Puisqu'il est bien connu que l'insuline active ces deux enzymes de façon dépendante à la PI3-k, ceci constitue un autre mécanisme rétroactif de régulation à la baisse de la PI3-k.

Hormis la phosphorylation des sérines/thréonines d'IRS-1, la phosphorylation de la PI3-k elle-même est un autre mécanisme potentiel de régulation de son activité (Dhand 1994). Il a été démontré à la fois *in vitro* et *in vivo*, que la sous-unité catalytique p110 $\delta$ , s'autophosphoryle sur la sérine 1039. Cette autophosphorylation est dépendante du temps et inhibe l'activité lipidique de la PI3-k (Vanhaesebroeck 1999). En contre partie, plusieurs études faites *in vitro* et *in vivo*, notamment chez les cellules CHO-HIR, ont démontré que l'insuline pouvait provoquer la phosphorylation de plusieurs tyrosines sur la p85 $\alpha$

(Hayashi 1992). Dépendamment des lignées cellulaires étudiées, il a été suggéré que ces phosphorylations pourraient réguler à la hausse l'activité de l'enzyme (Hayashi 1993).

En résumé, il est difficile d'étudier les mécanismes de régulation de la PI3-k car ils dépendent fortement du type cellulaire et des agonistes en cause. Cependant, il semble que la phosphorylation des sérines d'IRS-1 et de la PI3-k constitue un mécanisme de régulation à la baisse. La déphosphorylation d'IRS-1 par les PTPases joue un rôle également très important puisque c'est la phosphorylation des tyrosines d'IRS-1 qui permet l'interaction avec les domaines SH2 de la PI3-k.

### **Les phosphatases des ses produits**

Il existe une phosphatase qui reconnaît et déphosphoryle les produits de la PI3-k, la PTEN. On peut supposer qu'elle possède d'autres substrats, d'après sa grande homologie avec de multiples phosphatases à double spécificité (DSPases) et phosphatases de sérine/thréonine. Son effet antagoniste face à la PI3-k a souvent été corrélé avec son pouvoir de suppression de tumeurs (Leevers 1999).

D'après des études récentes, la phosphatase spécifique d'un des produits de la PI3-k, la SHIP, a été identifiée comme étant une phosphatase spécifique pour les PIP<sub>3</sub> et PIP<sub>4</sub>. En effet, elle hydrolyse un des produits de la PI3-k, le PI(3,4,5)P<sub>3</sub> en PI(3,4)P<sub>2</sub>. Une surexpression de SHIP par microinjection inhibe la stimulation faite par l'insuline sur la synthèse de l'ADN et le transport du glucose (Vollenweider 1999). SHIP est une grosse protéine contenant un domaine SH2. Elle interagit avec des récepteurs membranaires, des kinases de tyrosines et des protéines adaptatrices. (Liu 1999, Virkamäki 1999).

### **2.4.3 Ses substrats**

La PI3-k a la possibilité de modifier la composition de la membrane en phosphatidyl inositols. La fluidité de la membrane et la rareté de ses produits à l'état basal lui permettent de propager très rapidement son signal. Il a été

démontré *in vivo* que, les PIP<sub>2</sub> et PIP<sub>3</sub> peuvent participer à l'activation de plusieurs substrats via une kinase de thréonine, la "Phosphatidylinositol-3 dependent Kinase-1" (PDK1). À l'heure actuelle, le seul substrat bien caractérisé de la PDK1 est la PKB (Shepherd 1998).

### **La protéine kinase B**

La PKB est une kinase de sérine/thréonine cytoplasmique. Trois isoformes de la PKB ont été identifiées, PKB $\alpha$ , PKB $\beta$  et PKB $\gamma$ . La PKB $\alpha$  est le principal isoforme activé par l'insuline dans le muscle et le foie. Les PKB $\alpha$  et  $\beta$  jouent un rôle dans la signalisation de l'insuline dans les adipocytes, tandis que la PKB $\gamma$  n'est pas activée par l'insuline dans ces tissus. Des résultats démontrent que l'activation de la PI3-k est nécessaire et suffisante à l'activation de la PKB (Leevers 1999). Une autre étude démontre que l'AMPc (un composé pouvant activer des voies similaires à la PI3-k) peut activer la PKB de façon dépendante à la PI3-k (Cass 1999). Toutefois, cette voie reste à être davantage caractérisée.

En tant qu'effecteur de la PI3-k, la PKB est impliquée dans de nombreux phénomènes métaboliques comme le transport du glucose, la synthèse du glycogène, la glycolyse et la synthèse des protéines. De plus, la PKB est fortement impliquée dans les mécanismes de survie de la cellule et de l'inhibition de l'apoptose (Coffer 1998). La PKB possède un domaine "Pleckstrin Homology" (PH) lequel est impliqué dans le ciblage de l'enzyme à la membrane plasmique. Les domaines PH se lient aux têtes chargées des phosphatidyl inositols spécifiques, ce qui les dirige le plus souvent aux membranes (Leevers 1999). Les produits de la PI3-k, les PIP<sub>2</sub> et PIP<sub>3</sub>, se lient au domaine PH de PKB et PDK-1 (Currie 1999). Ceci engendre trois conséquences (figure 2.2; page 16). Tout d'abord, ils causent le recrutement de PKB et PDK-1 à la membrane plasmique. Par la suite, ces lipides provoquent un changement conformationnel permettant la phosphorylation de PKB par PDK-1 sur un résidu thréonine (Coffer 1998, Walker 1998). En d'autres mots, les PIP<sub>2</sub> et PIP<sub>3</sub> orientent la PKB pour qu'elle se fasse phosphoryler par PDK-1 (Meier 1999). De plus, la PKB est également phosphorylée sur un autre résidu, la sérine 473. Pour être

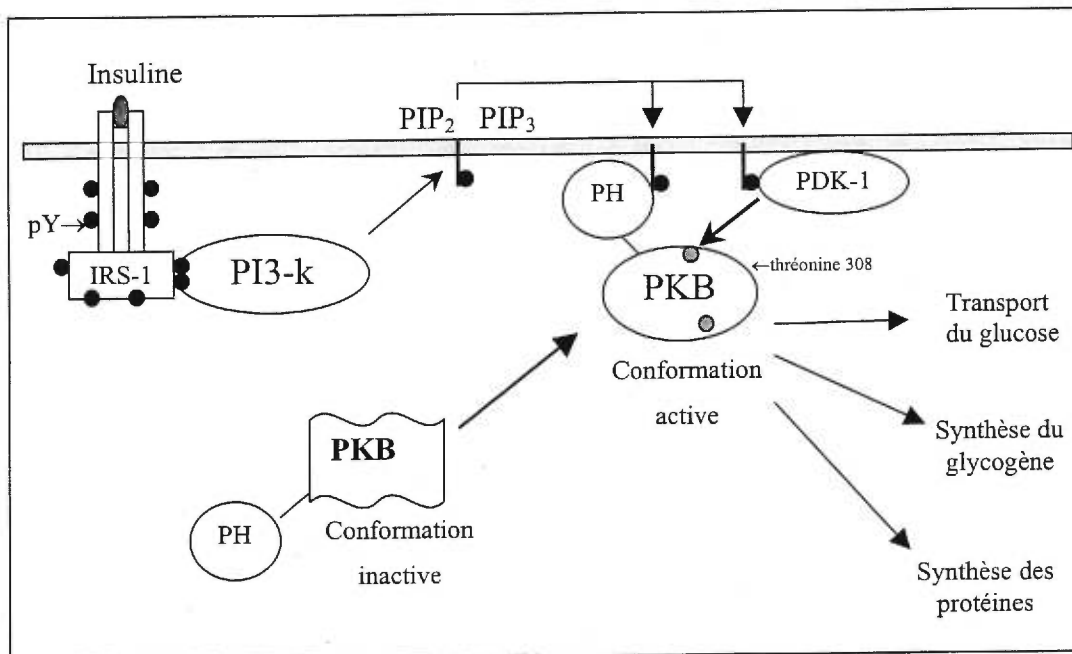


Figure 2.2. Mécanisme d'activation de la protéine kinase B (Downward 1998).

active, la PKB doit se faire phosphoryler sur ses deux résidus (thréonine 308 et sérine 473). La PKB peut ensuite se détacher de la membrane et phosphoryler ses substrats cytoplasmiques (synthèse du glycogène : GSK-3) et nucléaires (régulation du cycle cellulaire : E2F) (Downward 1998, Walker 1998). D'après Alex Toker, la sérine 473 est phosphorylée par autophosphorylation de la PKB qui a été préalablement phosphorylée sur la thréonine 308. Ceci est expliqué par l'absence de phosphorylation sur la sérine 473 de la part de l'enzyme dont le site catalytique est mort (Toker 2000, sous presse). Il se trouve que le principal opposant de la PDK1, dans la régulation de la phosphorylation de la PKB, est la phosphatase de sérine/thréonine, PP2A (Millward 1999).



### Ses autres substrats

Fait intéressant, il a été démontré que la PDK1 peut phosphoryler d'autres kinases de sérine/thréonine et ces phosphorylations sont requises pour l'obtention de leur activité maximale. Tout d'abord, la PDK1 peut phosphoryler la thréonine 229 de la kinase ribosomale p70<sup>s6k</sup> et participer à son activation (Alessi 1998). Cette kinase est impliquée dans la synthèse des protéines et est étroitement régulée par "mammalian Target of Rapamycin" (mTOR). Cette régulation est mal caractérisée en partie parce que mTOR est très homologue aux PI3-k (Thomas 1997). Il a déjà été démontré que la PDK-1 peut activer la p70<sup>s6k</sup> de façon indépendante à la PKB (Coffer 1998). Ceci suggère donc qu'il existe des voies d'activation de la p70<sup>s6k</sup> qui sont indépendantes de la PI3-k.

Il a été démontré que la PDK-1 participe également à l'activation de la protéine kinase A (PKA) en phosphorylant sa thréonine 197. Il a aussi été démontré que la PDK-1 phosphoryle la thréonine 410 de la PKC $\zeta$  de même que des résidus analogues sur d'autres isoformes de la PKC (Alessi 1998). Ce résidu est critique pour l'obtention de l'activité complète des PKC. De plus, PKC $\zeta$  et PDK-1 sont tous deux des effecteurs situés en aval de la PI3-k, pouvant activer les MEKs et les ERKs en réponse à l'insuline et ce, via GRB2, SOS, ras et Raf (Sajan 1999). Toutes ces enzymes ont plusieurs étapes d'activation et il n'est pas encore parfaitement connu si ces phosphorylations dépendent entièrement de l'action de la PI3-k sur la PDK1. Le seul substrat de la PDK1 qui dépend entièrement des PIP<sub>2</sub> et PIP<sub>3</sub> est la PKB (Leevers 1999).

## 2.5 La voie des MAPK

### 2.5.1 Généralités

Les "Mitogen-activated protein kinases" ou MAPK sont exprimées dans toutes les cellules eucaryotes (Robinson 1997). Elles font partie d'une cascade composée d'un module à trois composantes qui s'est conservé depuis la levure jusqu'à l'humain (Widmann 1999). Ce module est composé de trois kinases qui s'activent à tour de rôle. Le module converge vers l'activation des MAPKs, kinases de

sérine/thréonine activées par des MEKs. Les MEKs sont des kinases à double spécificité puisque qu'elles phosphorylent les résidus sérine/thréonine et tyrosine. Les MEKs sont activées par les kinases des MEKs (MEKKs). Les MEKKs sont des kinases de sérine/thréonine comme les raf (Elion 1998). Jusqu'à maintenant, il y a 14 MEKKs, 7 MEKs et 12 MAPKs identifiées chez les mammifères (Garrington 1999).

Plusieurs voies de signalisation convergent vers les MAPKs et on retrouve notamment les facteurs de croissance, l'insuline, les phorbols esters, l'acide okadaïque, le stress cellulaire, les irradiations, les réactifs dérivés de l'oxygène, les cytokines et les agonistes de récepteurs couplés aux protéines G (Robinson 1997). La première cascade ayant été caractérisée implique raf-MEK et converge vers les ERKs. C'est cette voie qui nous intéresse plus particulièrement puisqu'elle est activée par l'insuline. Par contre, l'activation de cette cascade n'a rien à voir avec les effets métaboliques de l'insuline comme le transport du glucose, la lipogénèse, le transport des acides aminés et l'inhibition de la lipolyse. Il existe plusieurs voies d'activation de la cascade des ERKs. La plus connue est transmise par les substrats du récepteur à l'insuline qui sont phosphorylés sur les résidus tyrosines. En effet, les IRSs (1 à 4) et Shc se lient à Grb2, grâce à ses deux domaines SH2. Grb2 est constitutivement associée avec un facteur d'échange de guanine, «son of sevenless» (sos). La liaison de Grb2 aux substrats du récepteur à l'insuline provoque le recrutement de sos à la membrane et active une phosphatase de guanine triphosphate (GTPase), ras. Cette enzyme active la cascade des ERKs. (Cheatham 1995, Virkamäki 1999).

### **2.5.2 Ras**

Ras est une GTPase membranaire qui active la cascade des ERKs. C'est un proto-oncogène très connu puisqu'il est muté dans 20-30% des cancers humains (Heimbrooke 1998). Elle est également appelée petite GTPase, faisant référence à son petit poids moléculaire et à sa structure monomérique. Ras est caractérisée par son pouvoir de liaison au GDP/GTP et par son activité enzymatique d'hydrolyse du GTP. La liaison du GTP (forme active) et de son

hydrolyse en GDP (forme inactive) génère un mécanisme d'interruption du signal. Par conséquent, cela décrit un cycle perpétuel entre le GDP et le GTP. Dans les cellules au repos, la plupart des ras lient le GDP même si habituellement le GTP est plus abondant. Le cycle entre ces deux conformations est étroitement régulé par plusieurs protéines. Les facteurs d'échange de nucléotide guanine (GEF) activent ras en stimulant le remplacement du GDP par GTP. Ras-GTP peut ensuite interagir avec plusieurs effecteurs en aval (figure 2.3; page 20). Cet état se termine par l'hydrolyse du GTP en GDP. L'activité GTPase intrinsèque de ras étant très faible, certaines protéines activatrices de GTPases (GAP) accélèrent l'activité de GTPase de ras, terminant le signal plus rapidement (Goalstone 1998).

Pour être actif, ras doit être localisée à la membrane plasmique. Pour ce faire, ras doit subir une prénylation, c'est-à-dire l'ajout d'un groupement farnésyle sur une cystéine dans la région carboxyle (figure 2.3; page 20). Tout mécanisme s'opposant à cette farnésylation empêchera ras d'être ciblée et elle demeurera inactive (Ceresa 1998). Ras reçoit son groupement farnésyle par une transférase de farnésyle (Ftase), une enzyme hétérodimérique ubiquitaire composée de deux sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$ . Ras est reconnue par cette Ftase, par un motif conservé dans la région C-terminale, CAAX, où C est la cystéine qui reçoit le groupement (Seabra 1998). Après cet ajout, ras se fait couper les trois derniers acides aminés de sa séquence CAAX et se fait méthyler sur sa cystéine farnesylée. Ces modifications secondaires sont nécessaires pour la stabilité de ras à la membrane (Goalstone 1998, Heimbrooke 1998).

Plusieurs études ont démontré que les ERKs, situées en aval de ras, sont activées par l'insuline et hyperphosphorylent sos. Cette hyperphosphorylation induit la dissociation du complexe Grb2-Sos, entraînant une baisse de l'échange de nucléotide de ras. Il a été suggéré que l'hyperphosphorylation de sos est un mécanisme de régulation à la baisse, et cela est responsable de la terminaison de la signalisation de l'insuline via ras. Ce mécanisme de rétro-inhibition explique pourquoi ras est activée de façon transitoire en réponse à l'insuline (Cherniack 1995, Corbalan-Garcia 1996, Langlois 1995, Klarlund 1995, Zhao 1998).

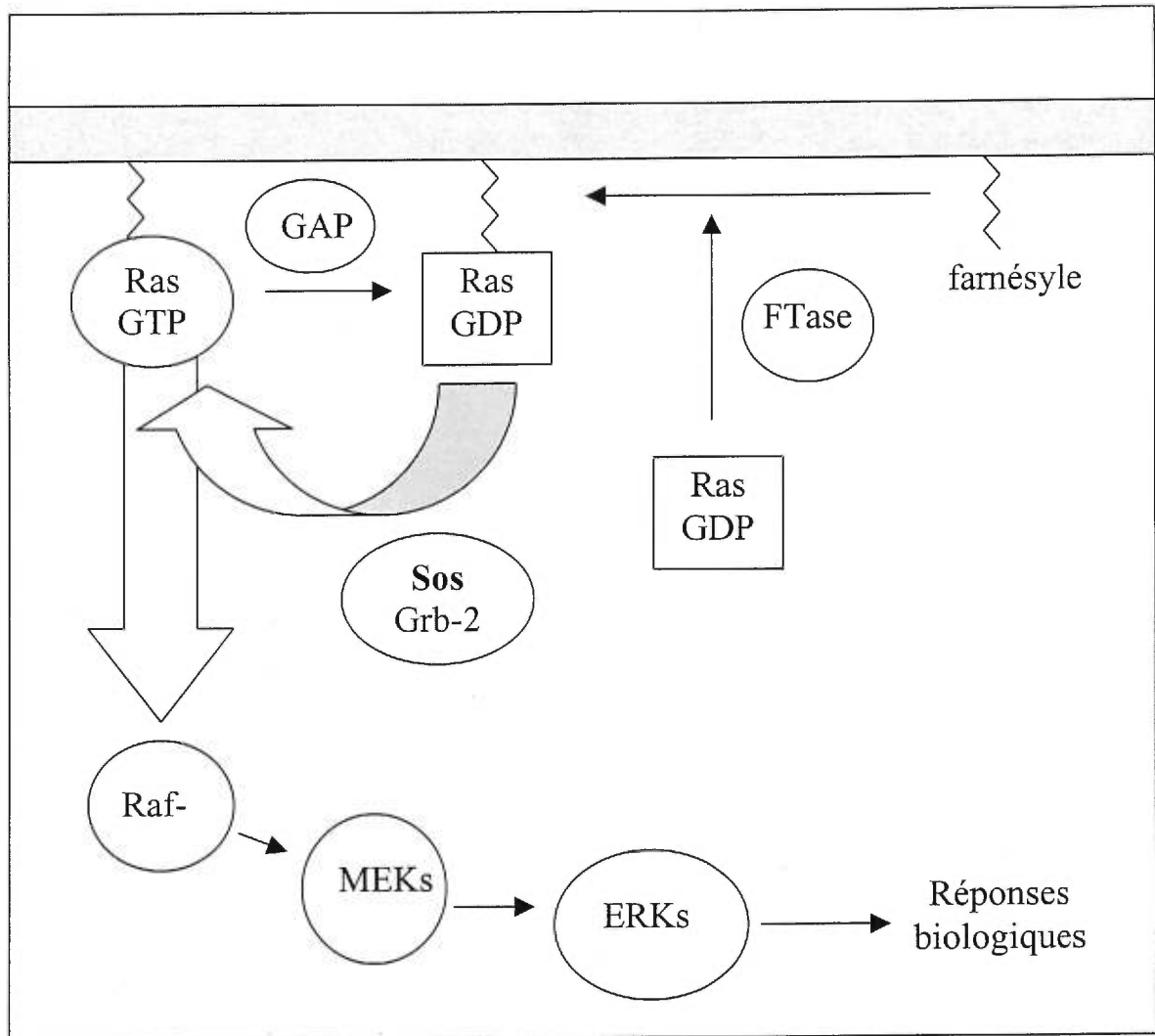


Figure 2.3. La régulation de l'activité de ras (inspiré de Goalstone 1998).

### 2.5.3 Raf-1

Raf-1 est exprimée dans tous les types cellulaires. Raf-1 est une kinase de sérine/thréonine et se trouve à la tête de la cascade des ERKs. Elle est considérée comme l'effecteur principal de ras (Heimbrooke 1998). La liaison de ras-GTP à raf-1 est nécessaire mais non suffisante à son activation complète. La régulation de raf-1 est très complexe et mal connue. Néanmoins, la littérature semble supporter un modèle de régulation de son activité mis de l'avant par Tzivion (Tzivion 1998). Celui-ci a démontré que raf-1 peut adopter deux conformations, l'une active et l'autre non. Ces dernières sont stabilisées par la protéine 14-3-3 (Morrison 1997). Le changement de conformation est provoqué par la liaison de ras-GTP (de Rooij 1997, Li 1993, Scheid 1999, Wang 1996).

De plus, la phosphorylation sur des résidus tyrosine et sérine/thréonine joue aussi un rôle dans la régulation de l'activité de raf-1. En effet, le ciblage de raf-1 à la membrane provoque sa phosphorylation sur les résidus tyrosine 340 et 341 (Morrison 1997). La mutation des résidus (sérine 621, tyrosine 340 et tyrosine 341) n'entraîne qu'une inhibition partielle de l'activité de raf-1. On peut ainsi en déduire que ces phosphorylations sont nécessaires mais non suffisantes pour l'obtention de l'activité maximale de raf-1. Ainsi, le traitement de raf-1 avec des PTPases l'inactive (Dent 1995, Holt 1996, Margolis 1999, Widmann 1999).

### 2.5.4 MEK 1/2

Les MEK 1/2 peuvent être recrutées par raf-1 grâce à leur domaine riche en proline. Les MEKs se font activer par raf-1 qui les phosphoryle sur leurs sérines 218 et 222 (Garrington 1999). Les MEKs sont des kinases à double spécificité, c'est-à-dire qu'elles phosphorylent des résidus tyrosine et sérine/thréonine. Les MEKs peuvent, à leur tour, activer les ERKs en les phosphorylant sur les résidus thréonine et tyrosine à l'intérieur d'une séquence Thréonine-Glutamate-Tyrosine dans leur site catalytique. Il a été suggéré qu'à l'état basal, les MEKs séquestrent les ERKs dans le cytoplasme (Widmann 1999). Ce n'est qu'après une stimulation que les MEKs phosphorylent et libèrent les

ERKs qui sont rapidement ciblées dans le noyau (Khokhlatchev 1998). De plus, il a été démontré que les MEKs sont impliquées dans le rétro-contrôle de leur propre cascade en phosphorylant sos et ce, de façon indépendante des ERKs (Holt 1996).

De plus, l'utilisation de l'inhibiteur spécifique pour les MEKs, PD98059, a permis de souligner le rôle des ERKs et MEKs dans l'action de l'insuline (Srivastava 1998). Il est connu que l'insuline peut, via les ERKs, stimuler la synthèse de l'ADN, la croissance cellulaire ainsi que la transcription de c-fos. Ces études suggèrent aussi que les ERKs ne seraient pas impliquées dans l'obtention des effets métaboliques de l'insuline. Cependant, il existe toujours une controverse à ce sujet depuis qu'il a été démontré que PD98059 peut inhiber complètement la stimulation de la synthèse du glycogène, induite par l'insuline, dans les hépatocytes de rats (Carlsen 1997).

### 2.5.5 ERK 1/2

Une fois activées par les MEKs, les ERKs phosphorylent une panoplie de protéines sur les résidus sérine/thréonine et ce, à l'intérieur d'une séquence consensus: Leucine-Sérine/Thréonine-Proline. Plusieurs protéines cytoplasmiques peuvent être phosphorylées par les ERKs comme la protéine ribosomale p90<sup>rsk</sup> et la phospholipase cytoplasmique A<sub>2</sub> (Seger 1995).

Par ailleurs, le premier substrat des ERKs qui fut caractérisé est la kinase ribosomale p90<sup>rsk</sup>. Telles les ERKs, la p90<sup>rsk</sup> est une kinase de sérine/thréonine et agit comme médiateur ubiquitaire très versatile. En effet, la p90<sup>rsk</sup> est impliquée dans la régulation des gènes via l'association et la phosphorylation de facteurs de transcription comme c-fos. De plus, la p90<sup>rsk</sup> est impliquée dans la synthèse des protéines via la phosphorylation des ribosomes et de GSK-3. De plus, la p90<sup>rsk</sup> participe au mécanisme de régulation à la baisse de la cascade ras-ERK par la phosphorylation de sos (Douville 1993). La p90<sup>rsk</sup> est composée de deux domaines kinases, lesquelles sont activées de manière séquentielle par une série de phosphorylations. La PDK1 est impliquée dans son activation complète (Frodin 1999).

Les ERKs phosphorylent et activent la phospholipase A<sub>2</sub> cytoplasmique, ce qui catalyse la relâche de l'acide arachidonique. Le métabolisme de ce composé met en circulation d'importants régulateurs d'autres phénomènes biologiques (Bokemeyer 1996, Widmann 1999).

Plusieurs protéines associées aux microtubules (MAP) sont aussi des substrats pour les ERKs, incluant: MAP-1, MAP-2, MAP-4 et Tau. Ces protéines sont impliquées dans la morphologie cellulaire et le réarrangement du cytosquelette. De plus, les ERKs sont capables de phosphoryler le facteur d'échange de nucléotides, sos de même que raf-1 et MEK-1 (Brunet 1994, Matsuda 1993, Nishida 1993). Ces phosphorylations impliquent une diminution de l'activité catalytique de ces enzymes. Par conséquent, leur phosphorylation par les ERKs engendre un mécanisme de rétroinhibition des constituants de la cascade des ERKs en amont de celles-ci (Cherniack 1995, Corbalan-Garcia 1996, Langlois 1995, Klarlund 1995, Waters 1995, Zhao 1998). Un de ces mécanismes implique l'hyperphosphorylation de sos par les ERKs. Dans au moins deux lignées cellulaires, cette hyperphosphorylation induit la dissociation de sos et Grb-2. Cette dissociation correspond à la désactivation de ras. De plus, sos contient sept sites consensus de phosphorylation par les ERKs et il a été démontré que sos est un substrat direct des ERKs (Waters 1995).

Une fois phosphorylées et activées, les ERKs peuvent être transloquées au noyau, là où elles peuvent phosphoryler et activer une panoplie de facteurs de transcription dont Elk 1, Ets 1, Sap 1a, c-Myc et Tal (Bokemeyer 1996, Widmann 1999).

Par leur grande diversité d'agonistes et leur champ d'action, les ERKs sont impliquées dans de nombreux phénomènes physiologiques très diversifiés et même opposés. Les ERKs jouent un rôle important lors de la prolifération et de la différenciation cellulaire de même qu'au niveau du contrôle du cycle cellulaire. Pour être en mesure de comprendre comment une enzyme peut réguler parfois la prolifération et parfois la différenciation, il faut s'attarder à sa cinétique enzymatique, c'est-à-dire à sa durée d'activation. Effectivement, il a été suggéré qu'une cellule pourrait initier un processus de différenciation ou de prolifération

selon la durée de l'activation des ERKs (Marshall 1995, Schramek 1996). Par exemple, dans les cellules PC-12, le facteur de croissance neuronal (NGF) stimule les ERKs pendant plusieurs heures conduisant à l'arrêt de la croissance cellulaire. Dans le même système, le facteur de croissance épithéliale (EGF) active les ERKs de façon transitoire stimulant la prolifération (Peraldi 1993). Les ERKs sont à la croisée des chemins menant à des phénomènes opposés. Il est donc impératif de considérer les mécanismes d'inactivation des enzymes telles les ERKs. Ces mécanismes impliquent l'action de phosphatases, le rétrocontrôle par phosphorylation et les interactions protéine-protéine.



## **CHAPITRE 3. LA RÉGULATION DE LA CASCADE DE SIGNALISATION DE L'INSULINE**

### 3.1 Le rôle de la phosphatidyl inositol-3 kinase au niveau de la voie des ERKs

Il est bien connu que la PI3-k peut activer la cascade des ERKs mais son mécanisme moléculaire n'est pas bien caractérisé. Par contre, il existe plusieurs hypothèses sur le sujet. Certaines suggèrent que la PI3-k pourrait activer la cascade via une protéine G couplée à un récepteur (Lopez-Illasaca 1997). Il a été également suggéré que certains isoformes de la PKC (PKC $\zeta$ ) puissent être activés par la PI3-k et impliqués dans l'activation de la voie des ERKs (Sajan 1999). De plus, il est bien connu que certains isoformes de la PKC (PKC $\delta$ ) activent la cascade des ERKs via raf-1 (Ueda 1996). Il est donc possible que la PKC puisse jouer le rôle d'un médiateur des effets de la PI3-k au niveau de la voie des ERKs (Standaert 1995). Il est également possible que la PI3-k puisse jouer le rôle de protéine d'échafaudage pouvant relier les composants de la cascade des ERKs. En effet, le segment N-terminal de la PI3-k- $\gamma$  présente une homologie significative avec une protéine d'échafaudage chez la levure (STE5) (Lopez-Illasaca 1998).

Une autre possibilité serait que la PI3-k active ras (Uehara 1995). Notre laboratoire et plusieurs autres avons démontré que la PI3-k (p85/p100 $\alpha$ ) et ras peuvent interagir ensemble (Pandey 1999, Rubio 1997). Cette interaction fut rapportée suite à une co-immunoprécipitation de la PI3-k avec ras (Rubio 1997, Sjolander 1991). Dans les lignées cellulaires, la PI3-k pourrait agir comme un effecteur ou un régulateur de ras. D'une part, il a été démontré que la transfection de ras constitutivement activée augmente le niveau de PIP<sub>2</sub> et PIP<sub>3</sub> et d'autre part, qu'un dominant négatif de ras pouvait bloquer l'activation de la PI3-k par les facteurs de croissance (Rodriguez-Viciano 1994). Il a aussi été démontré que, les domaines SH2 de la PI3-k sont essentiels pour l'activation de ras (Satoh 1993). De plus, plusieurs chercheurs et nous-mêmes avons démontré que la wortmannin pouvait inhiber l'activité de ras (Pandey 1999). En réponse à cela, il a été suggéré qu'une modulation réciproque de ces deux enzymes pourrait se produire (Rubio 1999). L'idée que la PI3-k pourrait être l'effecteur et le régulateur de ras a été supportée par la liaison exclusive de ras à la PI3-k ou à des GAP (Feig 1994).

### 3.2 Le rôle des kinases de sérine/thréonine

Récemment, la phosphorylation des résidus sérines/thréonines d'IRS-1 fut liée à l'atténuation de la signalisation de l'insuline et à la résistance à l'insuline (Qiao 1999). En effet, la phosphorylation des sérines/thréonines d'IRS-1 était 4 fois supérieure chez des cardiomyocytes de rats obèses, suggérant ainsi un rôle dans la pathogénèse de la résistance à l'insuline.

Le TNF $\alpha$  est considéré comme étant un élément clé dans plusieurs modèles de résistance à l'insuline (Kroder 1996). De plus, des cellules traitées de façon chronique avec du TNF $\alpha$  subissent une augmentation de la phosphorylation en sérine/thréonine d'IRS-1 engendrant une atténuation de la signalisation par l'insuline (Eldar-Finkelman 1997). D'ailleurs, des études *in vitro* ont démontré que la phosphorylation des sérines d'IRS-1 diminue sa phosphorylation en tyrosine par le récepteur à l'insuline dans des adipocytes et des hépatocytes (Feinstein 1993). Cette modification d'IRS-1 pourrait être un facteur dans l'acquisition de la résistance de l'insuline (Hotamisligil 1996). Par contre, ni la nature des kinases impliquées, ni l'action inhibitrice d'IRS-1 sur le récepteur n'ont été bien détaillées jusqu'à présent.

IRS-1 et IRS-2 contiennent plus de 30 résidus sérine/thréonine à l'intérieur de séquences consensus reconnues par plusieurs kinases de sérine/thréonine telles la caséine kinase II, PKA, PKC, ERKs et PKB (Cheatham 1995, Chin 1994, De Fea 1997, Li 1999, Mothe 1996, Tanasijevic 1993).

L'hyperphosphorylation des sérines d'IRS-1 peut également être attribuable à la GSK-3. C'est une kinase de sérine/thréonine active de façon constitutive et capable de phosphoryler les sérines d'IRS-1 (Elgar-Finkelman 1997). Cette enzyme est inhibée rapidement en présence de facteurs de croissance comme l'insuline (Qiao 1999).

Il a déjà été démontré que plusieurs kinases de sérine/thréonine peuvent phosphoryler IRS-1. La caséine kinase II phosphoryle IRS-1 principalement sur la

thréonine 502 et sur la sérine 99 (Tanasijevic 1993). Récemment, il a été démontré que GSK-3 et ERK2 phosphorylent IRS-1 *in vitro* et *in vivo*, convertissant IRS-1 en un inhibiteur de l'activité kinase du récepteur à l'insuline (De Fea 1997a). Dans certaines cellules, la PKB phosphoryle les sérines/thréonines d'IRS-1. D'après certaines études, ces phosphorylations rendent IRS-1 réfractaire au traitement avec des PTPases (Paz 1999). Malgré toutes ces découvertes, le lien entre les kinases de sérine/thréonine et la résistance à l'insuline reste à être plus fermement établi (Qiao 1999).

Chez les adipocytes, une surexposition à l'insuline engendre une désensibilisation caractérisée par une diminution du niveau d'IRS-1, ainsi que d'une augmentation de la phosphorylation des sérines. La phosphorylation en sérine d'IRS-1 par la PI3-k semble intervenir dans cette désensibilisation (Tanti 1994a). En effet, la PI3-k est nécessaire à cette dégradation puisque la wortmannin, un puissant inhibiteur de la PI3-k, bloque la dégradation d'IRS-1 induit par la surexposition à l'insuline (Lam 1994).

Une expérience avec de l'acide okadaïque, un puissant inhibiteur spécifique des phosphatases de type 1 et 2A, a démontré une hyperphosphorylation des sérines d'IRS-1 dans des adipocytes 3T3-L1. Il se produit également une inhibition de la stimulation faite par l'insuline sur la phosphorylation en tyrosines d'IRS-1, l'activité de la PI3-kinase et le transport du glucose (Tanti 1994b).

### **3.3 Le rôle des phosphatases de sérine/thréonine**

Il est connu depuis longtemps que l'activité des phosphatases est primordiale aux voies de transduction du signal dans les cellules. En fait, elles constituent un réseau de signalisation très complexe, en tenant compte de la régulation de leurs sous-unités et leur ciblage intracellulaire (Fauman 1996, Mumby 1993).

Comme dans tout équilibre, l'action des nombreuses kinases de sérine/thréonine doit être contre-balançées par celle des phosphatases de sérine/thréonine. Parmi ces phosphatases, la PP2A est plutôt intéressante puisqu'elle régule plusieurs voies de signalisation de l'insuline. En effet, la plupart de ces substrats sont des kinases impliquées dans de nombreux processus. On retrouve notamment PKB, PKC, p70<sup>s6k</sup>, raf-1, MEKs, ERKs, PKA, p90<sup>rsk</sup>, caséine kinase, etc... (figure 3.1; page 30) (Millward 1999). Ses actions sont donc innombrables et sont possibles grâce à la complexité de sa structure. En effet, la sous-unité catalytique de la PP2A peut s'associer avec plusieurs sous-unités régulatrices de ciblage.

Plusieurs études ont suggéré que la PP2A régule à la baisse la cascade de l'insuline et ce à plusieurs niveaux. En effet, des études faites *in vitro* ont démontré que la PP2A déphosphoryle les kinases MEKs et ERKs. En effet, ces kinases sont activées suite à un traitement à l'acide okadaïque, un inhibiteur de la PP2A (Tanti 1994a).

Il a été démontré que la PP2A est active à l'état basal et subit une inhibition transitoire après stimulation à l'insuline (Chajry 1996). Des résultats montrent que l'insuline peut phosphoryler la tyrosine 307 de la PP2A et l'inactiver (Chen 1994). Cette inactivation permet d'amplifier de façon transitoire l'activation des diverses cascades de signalisation (O'Brien 1996, Reusch 1994, Reusch 1995). Cette inhibition corrèle très bien avec l'activation des ERKs. Dans le cas des cellules 3T3-L1, PC12 Rat-1 et PAE, l'inactivation des ERKs est rapide et attribuable à l'action concertée de la PP2A et d'une PTPase (Bokemeyer 1996, Cook 1997, Ogata 1999, Todd 1999). Puisque la PP2A est cytoplasmique, ceci expliquerait l'inhibition rapide des ERKs et MEKs dans le cytoplasme (Millward 1999). Cependant, les ERKs sont aussi ciblées au noyau après leur activation et cela implique des phosphatases nucléaires.

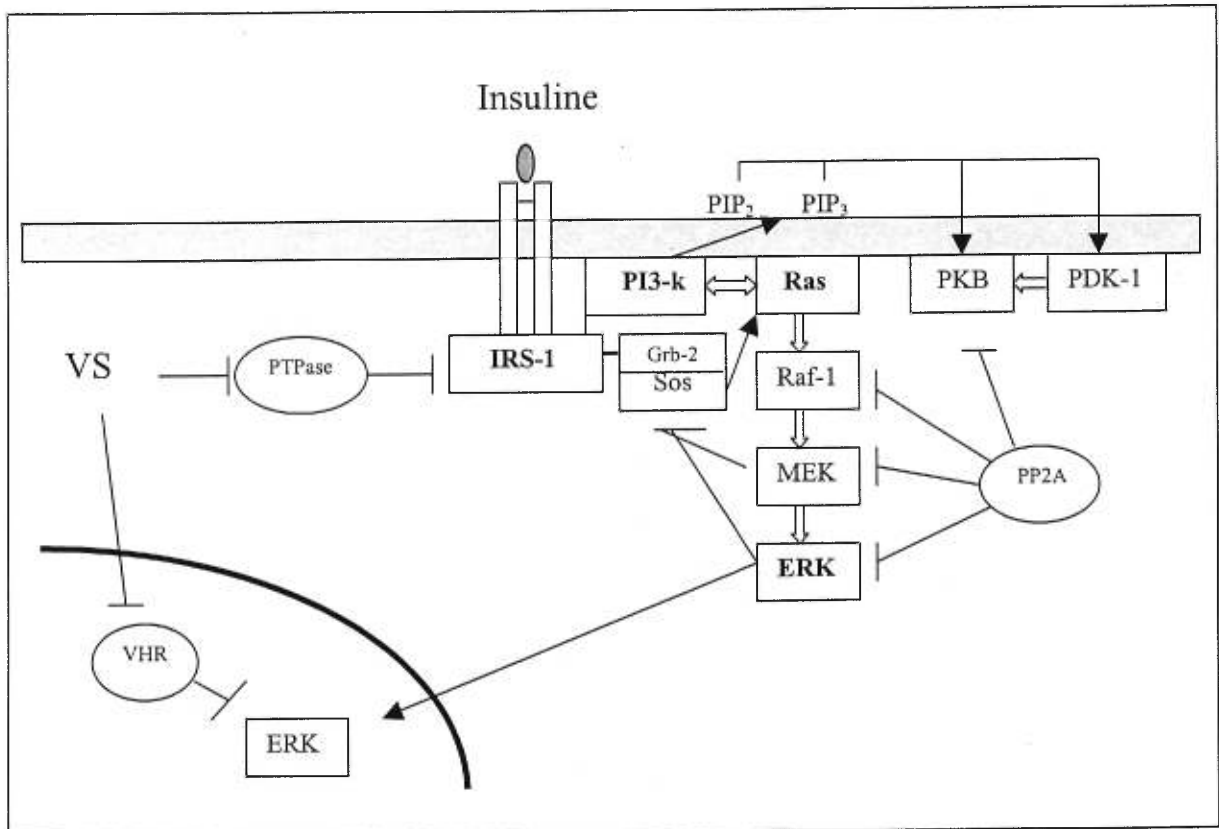


Figure 3.1. Le rôle potentiel de la phosphatidyl inositol 3-kinase dans la signalisation de l'insuline et du sulfate de vanadyle (inspiré de Bokemeyer 1996 et Downward 1998).

### 3.4 Le rôle des phosphatases de tyrosine

La transduction du signal de l'insuline implique la phosphorylation réversible de tyrosine sur des protéines spécifiques (Goldstein 1993). Le niveau de phosphorylation est étroitement régulé d'une part par des kinases de tyrosine (PTK) et d'autre part, par des PTPases. C'est l'action concertée de ces deux catégories d'enzymes qui assure la bonne transmission du signal (Hunter 1995, Stone 1994). Approximativement 75 PTPases ont été identifiées jusqu'à maintenant et le séquençage du génome prédit l'existence d'au moins 500 PTPases humaines (Neel 1997). Il existe deux grandes familles de PTPases, les phosphatases classiques et les phosphatases à double spécificité (DSPases).

#### 3.4.1 Les phosphatases de tyrosine classiques

Les PTPases classiques sont soit transmembranaires (RTPases) comme certains récepteurs (LAR), ou non transmembranaires (SHP, PTP-1B). Ces enzymes sont caractérisées par la présence d'au moins un site catalytique conservé, le domaine PTP. Ce site possède une séquence signature: "(I/V)HCxAGxxR(S/T)G" où la cystéine s'avère être primordiale pour l'hydrolyse du phosphate (Neel 1997). La plupart des RTP possèdent deux sites catalytiques dont un serait impliqué dans des interactions protéine-protéine (Elchebly 1999). La régulation de ces PTPases s'effectue par des modifications post-traductionnelles et/ou des interactions protéine-protéine qui modulent leur activité directement ou indirectement par leur ciblage cellulaire (Faux 1996).

Les PTPases jouent un rôle de premier plan dans la régulation de la signalisation de l'insuline. Il est bien connu que certaines PTPases sont exprimées dans des tissus sensibles à l'insuline pouvant ainsi réguler la phosphorylation réversible des tyrosines du récepteur à l'insuline et de ces substrats. Par conséquent, les PTPases sont impliquées dans la régulation négative de cette signalisation comme

c'est le cas pour la RPTPase LAR et les PTPases cytoplasmiques PTP-1B et SHP-2 (Bleyle 1999).

La RPTPase LAR est exprimée dans les tissus sensibles à l'insuline. Le délétion de cette PTPase par recombinaison génétique chez des souris n'a pas modifié leur sensibilité à l'insuline. Elle est considérée comme un régulateur négatif de l'action de l'insuline, *in vitro*. En effet, plusieurs expériences ont démontré indirectement qu'elle peut déphosphoryler le récepteur à l'insuline. La LAR est localisée à la membrane plasmique souvent près du récepteur à l'insuline (Goldstein 1998).

La PTPase cytoplasmique PTP-1B est omniprésente. Elle est également un régulateur négatif des actions métaboliques de l'insuline. La PTP-1B déphosphoryle le récepteur à l'insuline *in vitro* et dans des cellules intactes. En présence d'insuline, elle lie directement le récepteur à l'insuline *in vivo* et est phosphorylée sur des résidus tyrosine. La PTP-1B est localisée à la face cytoplasmique du réticulum endoplasmique (Frangioni 1992). Récemment, une étude a démontré que l'absence de cette phosphatase permet aux souris de résister au gain de poids face à une diète riche en graisse (Elchebly 1999, Ferber 1999). De plus, ces phosphatases de tyrosine sont souvent surexprimées dans nombreux cas de diabète (Ahmad 1995, Ahmad 1997, Cheung 1999).

Une autre PTPase impliquée dans la régulation de la voie de signalisation de l'insuline est SHP-2. Cette PTPase, aussi connue sous les noms de SH-PTP2, PTP-1D ou Syp, est une phosphatase de tyrosine qui se lie aux phosphotyrosines en C-terminal des IRS. Elle possède deux domaines SH2. Des études *in vitro* ont démontré que sa liaison à IRS-1 augmente son activité. Les substrats physiologiques de SHP-2 ne sont pas connus à ce jour (Myers 1998). Par contre, beaucoup de controverses existent au sujet de l'action de la SHP-2 sur l'action de l'insuline. Toutefois, il a été suggéré que cette PTPase joue plusieurs rôles et que son association avec IRS-1 pourrait atténuer d'importants signaux métaboliques de l'insuline (Ogawa



1998). Toute cette controverse naît probablement de réponses spécifiques aux cellules et il a été démontré que l'absence de SHP-2 provoque une augmentation de l'activité de la PI3-k et de la synthèse de protéines (Myers 1998).

### 3.4.2 Les phosphatases à double spécificité.

Les DSPases ont le pouvoir de déphosphoryler les phosphotyrosines et les phosphothréonines/sérines. Environ 15 à 20 DSPases ont été identifiées jusqu'à maintenant. Certaines d'entre elles ont un rôle à jouer dans la régulation du cycle cellulaire et les voies de signalisation impliquant les MAPKs. L'inactivation des ERKs reste un phénomène très mal expliqué mais pourtant d'une importance capitale puisque la cinétique enzymatique détermine leurs effets physiologiques (Peraldi 1993).

Ces ERKs sont activées par leur kinase à double spécificité, les MEKs. En effet, les MEKs sont capables de phosphoryler les ERKs sur les résidus thréonine 183 et tyrosine 185 (Cook 1997). Par opposition, plusieurs DSPases ont été impliquées dans la régulation à la baisse de l'activité des ERKs par la déphosphorylation de ces mêmes résidus (Cook 1997). Ces DSPases sont appelées Phosphatases de MAPK ou MKPs. Toutes ces MKPs, sauf Pyst 1, proviennent de la transcription rapide des gènes suite à la stimulation d'agents mitogéniques, de facteurs de croissance et divers stress. Ces MKPs sont principalement exprimées dans le noyau, elles peuvent ainsi facilement avoir accès aux ERKs nucléaires (Cook 1997). Par contre, l'expression de l'ARN/protéine des MKPs n'est normalement pas détectable avant 60 minutes après la stimulation (Brondello 1997, Duff 1995, Kusari 1997, Sun 1993). Par conséquent, la désactivation des ERKs par les MKPs *in vivo* n'est valable que si les ERKs demeurent activées de façon soutenue, c'est-à-dire pendant au moins une heure. Par contre, dans plusieurs lignées cellulaires, les ERKs sont déphosphorylées et désactivées très rapidement, c'est-à-dire entre 10 à 20 minutes (Wu 1994). Dans ce cas, l'inactivation n'impliquerait pas l'action de protéines nouvellement synthétisées comme les MKPs (Franklin 1997).

Il a été suggéré que l'inactivation rapide des ERKs serait due, d'une part, à leur action de rétroinhibition par phosphorylation des kinases en amont comme les MEKs et raf-1, de même qu'à la phosphorylation de sos. D'autre part, elle serait due à l'action de phosphatases constitutivement exprimées dans le noyau et le cytoplasme. En effet, il a été démontré que la PTPase VHR est capable de déphosphoryler le résidu tyrosine des ERKs *in vitro* et *in vivo* et qu'elle est exprimée constitutivement dans le noyau des cellules Cos-1 (figure 3.1; page 30) (Todd 1999).

### 3.4.3 L'importance des phosphatases de tyrosine

Il est maintenant bien connu que la phosphorylation des tyrosines du récepteur à l'insuline est réversible. Donc, le niveau d'activité du récepteur à l'insuline dépend, d'une part, de l'autophosphorylation induite par l'insuline et d'autre part, de la déphosphorylation induite par les PTPases. Par ailleurs, des récepteurs à l'insuline purifiés ne s'autodéphosphorylent pas et maintiennent leur niveau de phosphorylation *in vitro*, même après l'élimination de l'insuline (Kowalski 1983). Par contre, lorsqu'étudiée *in situ* dans des cellules intactes, la dissociation de l'insuline du récepteur est suivie d'une déphosphorylation rapide des sous-unités  $\beta$  et d'une désactivation subséquente (Haring 1984). Ainsi, les PTPases jouent un rôle central dans la régulation de l'action de l'insuline en déphosphorylant et en inactivant l'activité kinase du récepteur de façon à modifier et terminer le signal. Il est maintenant possible de spéculer que la réversibilité de la phosphorylation des différents domaines du récepteur à l'insuline et de ses substrats peut réguler différemment l'action de l'insuline. Ainsi, certaines PTPases pourraient orienter l'action induite par l'insuline vers certaines réponses spécifiques (Goldstein 1998).

Puisque les PTPases régulent surtout les premières étapes d'activation de la cascade de signalisation de l'insuline, cela souligne toute leur importance dans la régulation d'une telle cascade. Ainsi, les PTP-1B, LAR et SHP-2 peuvent avoir des implications dans toute la signalisation induite par l'insuline. Il a été démontré que l'inhibition de certaines PTPases entraîne l'augmentation de la signalisation de

l'insuline. Par conséquent, l'élaboration d'agents pharmaceutiques dirigés contre ces PTPases pourrait être à la base de traitements potentiels contre la résistance à l'insuline (Elchebly 1999).

Dans le cadre de l'étude d'une maladie comme le diabète, le défi est de vaincre la résistance à l'insuline. Un traitement alternatif à la thérapie à l'insuline serait l'élaboration de composés à base de vanadium. Il est déjà bien connu que les sels de vanadium sont des inhibiteurs de PTPases et peuvent diminuer la résistance à l'insuline à différents niveaux. Contrairement à l'insuline, le mécanisme d'action des sels de vanadium est mal caractérisé. Par conséquent, le but de ce projet est d'approfondir le mécanisme d'action insulino-mimétique du sulfate de vanadyle, faisant partie des sels de vanadium très étudiés.

## **DEUXIÈME PARTIE: PRÉSENTATION DES TRAVAUX.**

## MATÉRIELS ET MÉTHODES

### Matériels

Les cellules CHO-HIR proviennent du Dr M.F. White (Joslin Diabetes Center, Boston, MA). L'insuline provient de Eli Lilly Co. (Indianapolis, IN). La kinase MEK inactive et l'anti-sérum polyclonal C-raf-1 proviennent de R.K. Jaiswal (Case Western Reserve University, Cleveland, OH). L'anti-sérum polyclonal MEK et la p44 recombinante proviennent du Dr S. Meloche (Université de Montréal). La wortmannin et le phosphatidyl inositol proviennent de Sigma Chemical Co. (St-Louis, Mo). Le LY294002 provient de Biomol (Philadelphia, PA) et le VS de Aldrich Chemical Co. (Milwaukee, WI). L'anticorps monoclonal anti-phosphotyrosine (4G10), l'anti-récepteur à l'insuline, l'anti-IRS-1 et l'anticorps polyclonal de MAPK proviennent de Upstate Biotechnology (Lake Placid, NY). L'anti-souris et l'anti-lapin IgG conjugués à la peroxidase ainsi que l'anti-phosphospécifique-PKB (sérine 473) et l'anti-phosphospécifique p44/p42 (Thr202/Tyr204) proviennent de New England Biolabs (Beverly, MA). Les billes de protéine-A-Sépharose proviennent de Pharmacia Biotech Inc. (Mississauga, ON). L'inhibiteur de la farnésyltransférase, B581, provient de Bachem Bioscience Inc. (King of Prussia, PA). Le système de détection par la chemoluminescence (ECL) provient d'Amersham Pharmacia Biotech (Baie d'Urfé, PQ). L'anti-H-ras monoclonal et l'anti-p85 polyclonal proviennent de Santa Cruz Biotech (Santa Cruz, CA). L'anti-pan-ras provient de Calbiochem (San Diego, CA). La protéine de fusion glutathione S-transférase liant le domaine de liaison à ras de raf-1 (GST-RBD) provient du Dr J.L. Bos (Université d'Utrecht, Netherlands). Les plaques de silice proviennent de Merck & Co. Inc. (Rahway, NJ).

## Méthodes

### Culture cellulaire

Les cellules ont été cultivées avec du milieu HAM F-12 supplémenté de 10% de sérum de bœuf fœtal dans des pétris de 10 cm. Les cellules ont été cultivées jusqu'à confluence avant d'être privées de sérum pendant 15 heures (Pandey 1995).

### Dosage de l'activité des ERKs

Les cellules ont été solubilisées dans le tampon A [25 mM Tris-HCl (pH 7.5), 25 mM NaCl, 1 mM orthovanadate de sodium, 10 mM fluorure de sodium, 10 mM pyrophosphate de sodium, 20 nM acide okadaïque, 0.5 mM acide éthylènebis(oxoéthylène)triacétique (EGTA), 1 mM phénylméthylsulfonyl fluorure (PMSF), 10 µg/mL aprotinine, 1% Triton X-100 et 0.1% dodécyl sulfate de sodium (SDS)]. Les lysats ont ensuite été clarifiés par centrifugation pour retirer les matières insolubles. Ces lysats clarifiés ont été normalisés pour obtenir 100 µg de protéines et incubés 4h à 4°C avec 5 µg d'anti-MAPK déjà lié avec des billes de protéines-A-Sépharose. L'immunoprécipité a été recueilli par centrifugation et lavé trois fois avec le tampon A et une fois avec le tampon B [20 mM Hepes (acide N-(2-hydroxyéthyl)piperazine-N'-2-éthanesulfonique) pH 7.4, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM dithiothreitol (DTT), et 10 mM β-glycérophosphate]. On a ajouté 40 µl de tampon kinase [25 mM Tris-HCl pH 7.4, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM MnCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT, 1 µM staurosporine, 0.5 mM EGTA et 10 µL de 1 mg/mL de protéine basique de myéline (MBP)]. La réaction a été initiée par l'ajout de 5 µL de 1 mM d'ATP avec 0.5 µCi d'ATP marquée au <sup>32</sup>phosphate (ATP[γ-<sup>32</sup>P]) (activité spécifique de 3000 Ci/mmol; Amersham). La réaction s'est déroulée à 30°C pendant 12 min et s'est arrêtée en déposant le surnageant sur des papiers P-81 qui ont été lavés dans d'acide phosphorique (0.5%). La radioactivité a ensuite été comptée (Pandey 1998).

### **Immunobuvardage des lysats cellulaires**

Une fois stimulées, les cellules ont été solubilisées dans le tampon A sur glace. Les lysats ont ensuite été clarifiés par centrifugation à 10000g pendant 12 min. La même quantité de protéines a été séparée par électrophorèse avec un SDS-PAGE 10% (conditions réductrices). Les protéines ont été transférées sur une membrane de PVDF et incubées avec soit un anti-phosphotyrosine (1:1000), soit un anti-phosphospécifique-ERK1/2 (1:1000), soit un anti-phosphospécifique-PKB (1: 1000). La phosphorylation de ces protéines a été détectée avec un anti-lapin ou un anti-souris (1: 2000) à l'aide du système de détection ECL.

### **La liaison *in vitro* de ras active à la GST-RBD**

La protéine de fusion glutathione S-transférase contenant le domaine minimal de liaison à ras (acides aminés 51-131) de raf-1 a permis de déterminer la quantité relative de ras-GTP (conformation active) (de Rooij 1997). La GST-RBD a été liée à des billes d'agarose-gluthathione en 45 min à la température de la pièce. Ce complexe a été incubé 45 min à 4°C avec les lysats clarifiés. Les billes ont été précipitées par centrifugation et lavées deux fois dans le tampon A pour être ensuite solubilisées dans du tampon Laemmli. Les protéines de ces échantillons ont ensuite été séparées par électrophorèse SDS-PAGE 15% et immunodétectées avec un anti-pan-ras monoclonal. Cet anticorps reconnaît plusieurs isoformes (K-ras, N-ras et H-ras)

### **Dosage de l'activité de la PI3-k**

Les lysats clarifiés et normalisés pour la quantité de protéines ont été immunoprécipités avec soit un anti-H-ras, soit un anti-IRS-1, ou un anti-p85 en deux heures à 4°C et ont été incubés avec des billes de protéine-A-Sépharose pendant 2 heures. L'anticorps dirigé contre p85 va reconnaître plusieurs isoformes (p85 $\alpha$  et p85 $\beta$ ). L'immunoprécipité a été recueilli par centrifugation et lavé trois fois avec le

tampon A, une fois avec du tampon phosphate (PBS), une fois avec du 0.5 M LiCl, 0.1 M Tris-HCl, (pH 7.5), une fois avec de l'eau et une fois avec un autre tampon [20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 10 mM NaCl, 0.5 mM EGTA]. On a ajouté 1  $\mu$ L de phosphatidyl inositol (10 mg/ml dans le diméthyl sulfoxyde, DMSO). Le précipité a été agité et incubé 10 min à la température de la pièce. La réaction kinase a débuté par l'ajout de 10  $\mu$ Ci d'ATP ( $\gamma$ - $^{32}$ P) et 10 mM MgCl<sub>2</sub>. La réaction a été arrêtée après deux minutes par l'ajout de 150  $\mu$ L de CHCl<sub>3</sub>:CH<sub>3</sub>OH:HCl 1N (100:200:2) et 100  $\mu$ L de CH<sub>3</sub>Cl a été ajouté pour séparer les phases. La phase inférieure a été lavée avec un volume de CH<sub>3</sub>OH:HCl 1N (1:1). Les lipides recueillis ont été concentrés *in vacuo* et déposés sur une plaque de silice pour y être développés par chromatographie verticale dans du CHCl<sub>3</sub>:CH<sub>3</sub>OH:NH<sub>4</sub>OH:H<sub>2</sub>O (43:38:5:7). Les lipides marqués ont été visualisés par autoradiographie et quantifiés par phosphorimager (Pandey 1995).

### **Détection de la phosphorylation de tyrosines du récepteur à l'insuline et d'IRS-1**

Les lysats clarifiés et normalisés pour la quantité de protéines ont été immunoprécipités soit avec un anti-récepteur à l'insuline ou un anti-IRS-1 en deux heures à 4°C et ont été incubés avec des billes de protéine-A-Sépharose pendant 2 heures. L'immunoprécipité a été recueilli par centrifugation et lavé deux fois avec un tampon (50 mM Hepes pH 7.5, 0.1% Triton, 0.1% SDS) et une fois avec le même tampon mais sans SDS. Les protéines ont été solubilisées dans du tampon Laemmli et séparées par électrophorèse dans un SDS-PAGE 10% (conditions réductrices). Les protéines ont été ensuite transférées sur une membrane de PVDF et incubées avec un anti-phosphotyrosine (1:1000). La phosphorylation de ces protéines a été détectée avec un anti-souris (1: 2000) à l'aide du système de détection ECL (Pandey 1998).

### **Dosage de l'activité des MEKs**

L'activité des MEKs a été mesurée par leur pouvoir d'augmenter l'activité de p44<sup>MAPK</sup> recombinante face à un substrat exogène, le MBP. Les échantillons ont été préparés comme pour le dosage d'activité des ERKs. La même quantité de protéines



(100 µg) a été incubée avec 1 µL de l'anti-sérum MEK preabsorbé avec des billes de protéine-A-Sépharose. L'immunoprécipité a ensuite été lavé une fois avec un tampon [20 mM Hepes, pH 7.4, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT]. Le culot a été resuspendu dans ce tampon avec 50 µM d'ATP, 5 µCi d'ATP ( $\gamma$ -<sup>32</sup>P), 300 ng de p44<sup>MAPK</sup> recombinante. Après une incubation de 30 min à 30°C, 0.25 mg/mL de MBP a été ajouté pour une incubation de 10 min. La réaction a été arrêtée par l'ajout de 40 µL de tampon Laemmli. Les protéines ont ensuite été séparées dans un SDS-PAGE de 10% et transférées sur une membrane de PVDF. La radioactivité associée au MBP a finalement été quantifiée par phosphorimager.

### **Dosage d'activité de raf-1**

Les échantillons ont été préparés comme pour le dosage d'activité des MEKs sauf que l'immunoprécipitation s'est effectuée avec 1 µL d'anti-raf-1 polyclonal. Le substrat de la réaction était la kinase MEK inactive.

### **Dosage des protéines**

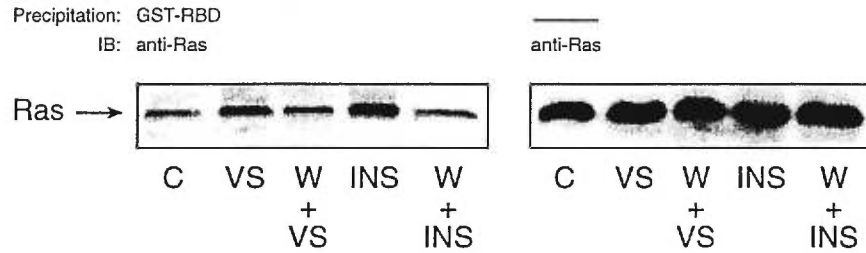
La concentration en protéine des lysats cellulaires a été déterminée par la méthode Bradford.

**CHAPITRE 4. RÔLE DE LA PHOSPHATIDYL INOSITOL-3 KINASE DANS  
L'ACTION INSULINOMIMÉTIQUE DU SULFATE DE VANADYLE. †**

#### 4.1 L'effet de la wortmannin sur l'activation de ras par le sulfate de vanadyle.<sup>†</sup>

L'insuline stimule l'activité de ras via l'échange de GDP en GTP par sos (Goalstone 1998). La forme active de ras est celle liée au GTP. Nous avons voulu savoir si le VS pouvait activer ras tout comme le fait l'insuline. Pour ce faire, nous avons immunodéecté les ras activées (ras-GTP) grâce au RBD de raf-1 (de Rooij 1997). Le principe est simple car la GST-RBD permet de précipiter les ras qui sont aptes à se lier à raf-1, c'est-à-dire les ras activées. Nos résultats démontrent qu'en présence de VS ou d'insuline, la GST-RBD fait précipiter plus de ras-GTP par rapport au niveau basal (C) (figure 4.1; page 44 à gauche). Des résultats préliminaires (non montrés) nous ont démontré que la wortmannin seule n'engendrait aucun effet significatif sur l'activité basale de ras.

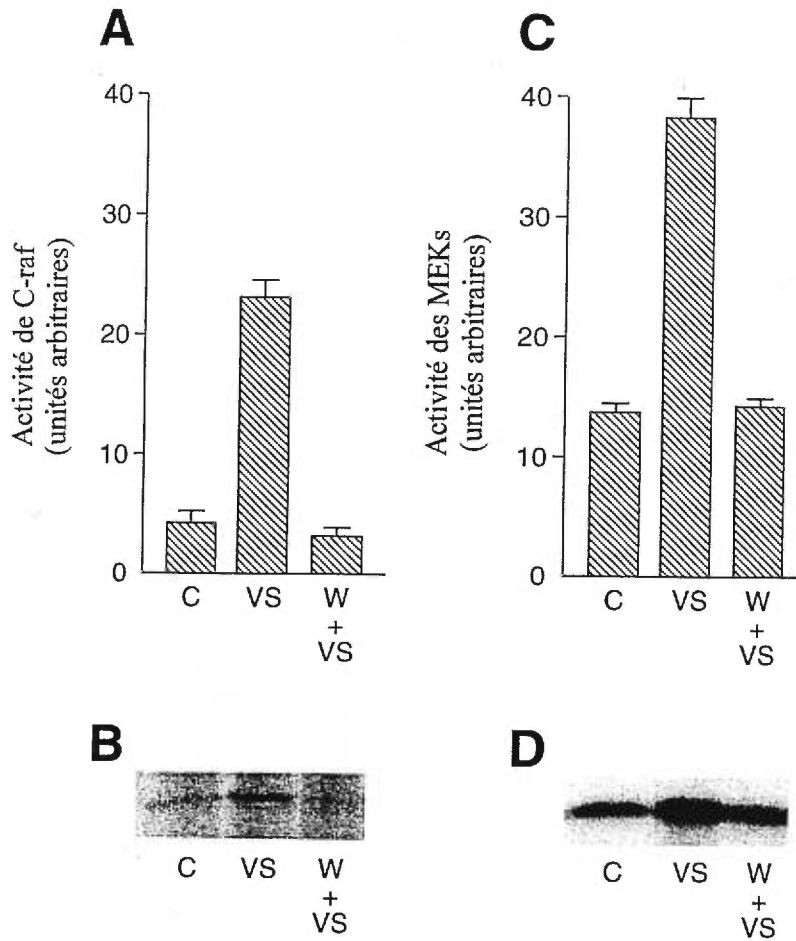
Dans la signalisation de l'insuline, il est connu que la PI3-k peut réguler la voie des ERKs (Lopez-Ilasaca 1998, Rubio 1999). Toutefois, le mécanisme exact reste à découvrir. Ceci nous a poussé à étudier l'effet de la PI3-k au niveau de l'activation de ras par le VS. Ainsi, nos résultats démontrent que les niveaux de ras activées, induit par le VS ou l'insuline, diminue en présence de wortmannin (100 nM; 10 min) (figure 4.1; page 44 à gauche). Il est à noter qu'il n'y a aucun changement au niveau de la quantité de ras (figure 4.1; page 44 à droite). Ainsi, nos résultats suggèrent que le VS et l'insuline activent ras et ces activations sont sensibles à la wortmannin. Puisque la wortmannin est utilisée avec des concentrations de l'ordre du nanomolaire, elle constitue un inhibiteur très puissant et très sélectif de la PI3-k. Nous suggérons donc que la PI3-k est requise pour l'activation de ras par le VS et l'insuline.



**Figure 4.1. L'effet de la wortmannin sur l'activation de ras par le sulfate de vanadyle.**<sup>†</sup> Les cellules CHO-HIR ont été pré-incubées avec ou sans wortmannin (100 nM) pendant 10 min, suivi d'une incubation avec ou sans insuline (100 nM) ou avec ou sans VS (100  $\mu$ M) pendant 5 min. Les lysats cellulaires ont été préparés et incubés avec la protéine de fusion GST-RBD. Ces échantillons ont ensuite été immunodétectés avec un anti-pan-ras (figure 4.1, à gauche). La quantité de ras fut aussi détectée. Dans ce cas, les échantillons bruts furent immunodétectés sans purification au préalable (figure 4.1, à droite). Ces deux figures représentent deux expériences indépendantes.

## **4.2 L'effet de la wortmannin sur l'activation de C-raf-1 et des MEKs par le sulfate de vanadyle. †**

Nous venons de démontrer que ras est impliquée dans la signalisation induite par le VS et que la PI3-k a un rôle important à jouer dans cette activation. Au niveau de la signalisation de l'insuline, il est connu que ras peut activer la cascade des ERKs via raf-1 et les MEKs (Garrington 1999). Il est donc intéressant de savoir si le VS pourrait suivre cette voie. Nous avons donc étudié l'effet du VS sur l'activité de raf-1 et des MEKs. Nos résultats démontrent que le VS stimule l'activité de raf-1 et des MEKs d'environ respectivement cinq et deux fois le niveau basal (C) (figure 4.2; page 46). Dans le but de mieux caractériser le rôle de la PI3-k dans cette voie, nous avons encore étudié l'effet de la wortmannin sur ces activations. Ainsi, nous avons démontré qu'en présence de wortmannin (100 nM; 10 min), l'activation de ces enzymes est complètement bloquée. Nos résultats suggèrent que le VS active les raf-1 et les MEKs de façon dépendante de la PI3-k. Des résultats préliminaires (non montrés) nous ont démontré que la wortmannin seule n'engendrait aucun effet significatif sur l'activité basale de ces enzymes.

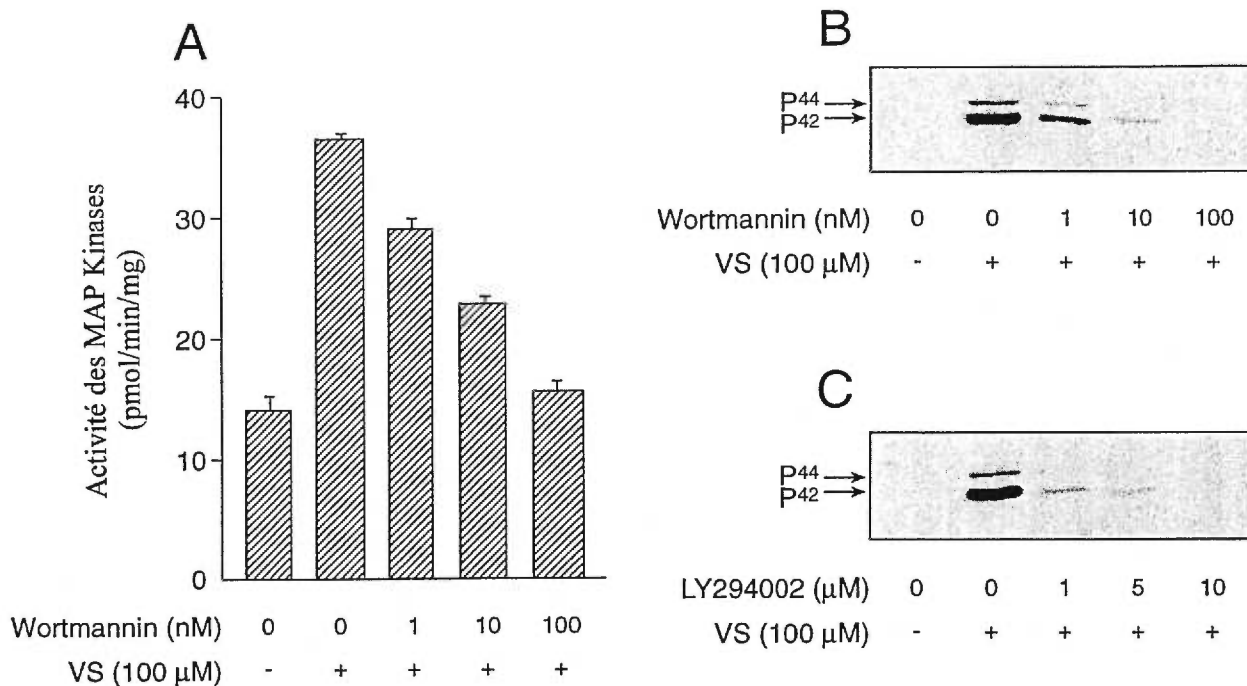


**Figure 4.2. L'effet de la wortmannin sur l'activation de C-raf-1 et des MEKs par le sulfate de vanadyle.**<sup>†</sup> Les cellules CHO-HIR ont été pré-incubées avec ou sans wortmannin (100 nM) pendant 10 min, suivi d'une incubation avec ou sans VS (100  $\mu$ M) pendant 5 min. L'activité des MEKs a été dosée en mesurant l'augmentation de l'activité des ERKs recombinants face au MBP. La réaction kinase a été séparée par SDS-PAGE, transférée sur membrane PVDF, visualisée par autoradiographie (A) et quantifiée par phosphorimager (B). L'activité de C-raf-1 a été dosée en utilisant la kinase MEK inactive comme substrat. La réaction kinase a été séparée par SDS-PAGE, transférée sur membrane PVDF, visualisée par autoradiographie (C) et quantifiée par phosphorimager (D). Les autoradiographies représentent trois expériences indépendantes et les quantifications résultent de la moyenne de ces expériences.

### 4.3 L'effet de la wortmannin et du LY294002 sur l'activation des ERKs par le sulfate de vanadyle. †

Nous venons de démontrer que le VS active ras, raf-1 et les MEKs de façon dépendante à la PI3-k. Il est déjà connu que le VS active les ERKs (Pandey 1995). Toutefois, le mécanisme d'action du VS n'est pas bien caractérisé. Dans la signalisation de l'insuline, il est connu que l'activation des ERKs est induite par les MEKs (Khokhlatchev 1998). Nous nous sommes donc intéressé à l'effet du VS au niveau de l'activation des ERKs. Nos résultats démontrent que le VS active les MAPK p42, p44 (ERKs) d'environ deux fois le niveau basal (C) (figure 4.3 A; page 48). De plus, nous avons, encore une fois, étudié le rôle de la PI3-k. Ainsi, nos résultats démontrent qu'une pré-incubation avec différentes concentrations de wortmannin (1, 10, 100 nM; 10 min) peut inhiber l'activation faite par le VS. Nous observons une inhibition de l'activité des ERKs par la wortmannin de façon dépendante à sa concentration.

Il est bien connu que les ERKs doivent être phosphorylées sur deux résidus critiques (thréonine 202 et tyrosine 204) pour être activées (Widmann 1999). Nous avons confirmé l'activation des ERKs, déjà décrites, en détectant la phosphorylation de leurs résidus critiques. Nos résultats démontrent qu'en réponse au VS, les ERKs sont phosphorylées sur leurs résidus critiques. De plus, nous avons testé l'effet de deux inhibiteurs de la PI3-k, la wortmannin et le LY294002, sur cette augmentation de phosphorylation des ERKs. De façon similaire, nos résultats démontrent que les différentes concentrations de wortmannin (1, 10, 100 nM; 10 min) et de LY294002 (1, 5, 10  $\mu$ M; 30 min) inhibent la phosphorylation des ERKs induite par le VS (figures 4.3 B et 4.3 C; page 48). Encore une fois, nous observons des inhibitions de la phosphorylation de façon dépendante à la concentration des inhibiteurs. Nos résultats suggèrent que le VS active les ERKs en phosphorylant leurs résidus critiques et ce, de façon dépendante à la PI3-k.

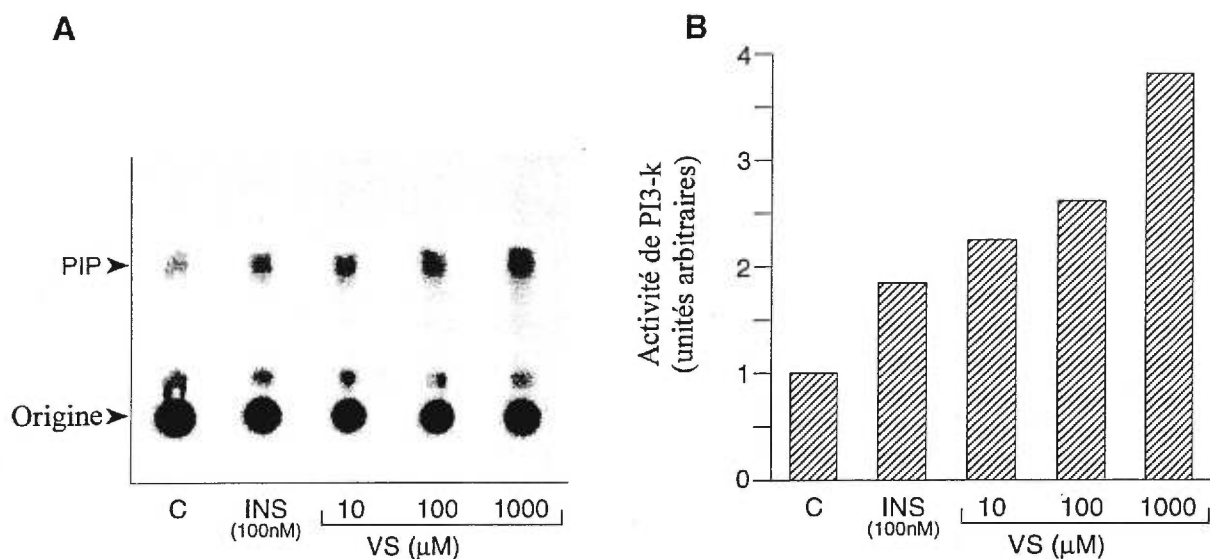


**Figure 4.3. L'effet de la wortmannin et du LY294002 sur l'activation des ERKs par le sulfate de vanadyle.** <sup>†</sup> Les cellules CHO-HIR ont été pré-incubées avec différentes concentrations de wortmannin (1, 10, 100 nM) pendant 10 min ou de LY294002 (1, 5, 10 μM) pendant 30 min, suivi d'une incubation avec ou sans VS (100 μM) pendant 5 min. L'activité des ERKs a été dosée et sa quantification est la moyenne de trois expériences indépendantes (A). À partir des mêmes stimulations, la phosphorylation des deux résidus critiques pour l'activité des ERKs (Thr202/Tyr204) a été détectée par un immunobuvardage avec un anti-phosphospécifique-ERKs (B et C). Ces deux autographies représentent deux expériences indépendantes.



#### **4.4 L'activation de la phosphatidyl inositol-3 kinase par le sulfate de vanadyle et l'insuline. †**

De manière similaire à l'insuline, nous venons de démontrer que le VS active la voie ras-raf-MEKs-ERKs de façon dépendante à la PI3-k. Il est déjà connu que le VS active la PI3-k lorsqu'elle est immunoprécipitée par sa sous-unité régulatrice p85 ou co-immunoprécipitée avec des IRS (Pandey 1998). Il a été démontré qu'une modulation réciproque de l'activité de ras et de la PI3-k pourrait se produire (Rubio 1999). Toutefois, le mécanisme d'activation de ras par la PI3-k n'est pas bien défini. Nous voulons maintenant en savoir plus sur le lien entre la PI3-k et ras. Pour ce faire, nous avons mesuré l'activité de la PI3-k en la co-immunoprécipitant avec ras. Nos résultats démontrent qu'il existe bel et bien une interaction physique entre ras et la PI3-k en réponse au VS et à l'insuline. En effet, nous observons une augmentation de l'activité de la PI3-k en réponse à l'insuline (100 nM; 5 min) et à différentes concentrations de VS (10, 100, 100  $\mu$ M; 5 min) (figure 4.4; page 50). Nos résultats démontrent que l'augmentation de l'activité de la PI3-k est dépendante de la concentration de VS. Nos résultats suggèrent que le VS, comme l'insuline, provoque l'interaction entre ras et la PI3-k. Il est donc possible que cette interaction puisse jouer un rôle important dans l'action du VS.



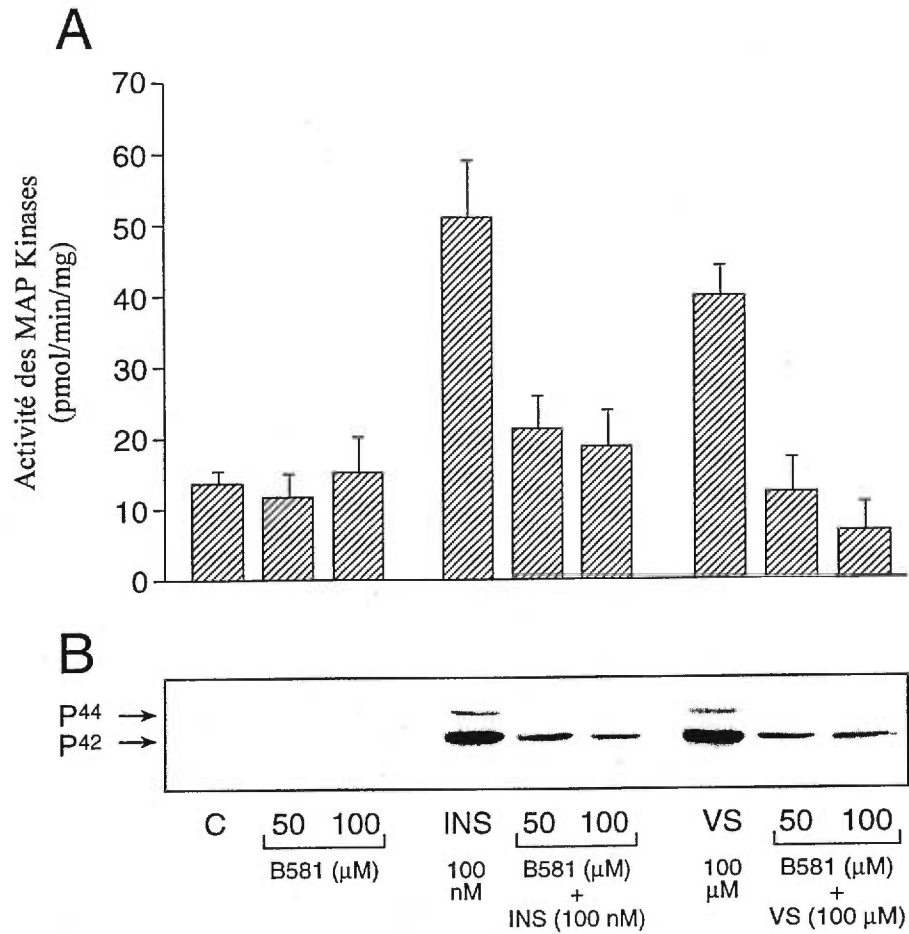
**Figure 4.4. L'activation de la phosphatidyl inositol-3 kinase par le sulfate de vanadyle et l'insuline.**<sup>†</sup> Les cellules CHO-HIR ont été incubées avec ou sans insuline (100 nM) ou avec ou sans différentes concentrations de VS (10, 100, 1000 μM) pendant 5 min. Le dosage de l'activité de la PI3-k a été fait à partir de l'immunoprécipitation avec un anti-pan-ras. Une autoradiographie représentant deux expériences indépendantes (A) ainsi que sa quantification par phosphorimager (B) sont représentées.

#### 4.5 L'effet d'un inhibiteur de la farnésylation de ras sur l'activation des ERKs par le sulfate de vanadyle. †

Nous avons démontré que le VS active la voie ras-raf-MEKs-ERKs de façon dépendante à la PI3-k. De plus, nous venons de démontrer que le VS induit une interaction physique entre la PI3-k et ras. Dans la signalisation de l'insuline, le rôle de la PI3-k au niveau de la voie des ERKs est controversée. Il est possible que la PI3-k puisse réguler cette voie de façon indépendante de ras (Cross 1994, Lopez-Illasaca 1997, 1998, Sajan 1999, Ueda 1996). Dans le but d'approfondir le rôle de ras dans l'action du VS, nous avons étudié l'effet d'un inhibiteur de la farnésylation au niveau de l'activation des ERKs. La farnésylation de ras est essentielle pour que ras puisse être ciblée à la membrane plasmique et activée par l'insuline (Ceresa 1998).

Nos résultats démontrent que la pré-incubation des cellules CHO-HIR avec différentes concentrations de l'inhibiteur de farnésylation B581 (50, 100  $\mu$ M; 24h), bloque l'activation des MAPK (ERKs) induite par l'insuline et le VS (figure 4.5 A; page 52). Nos résultats démontrent aussi que les mêmes pré-incubations avec le B581 bloquent la phosphorylation des résidus critiques des ERKs (figure 4.5 B; page 52). Nos résultats suggèrent que le VS, tout comme l'insuline, active les ERKs en phosphorylant leurs résidus critiques et ce, de façon dépendante de la farnésylation. Nous supposons donc que la farnésylation de ras est importante pour l'activation de la voie des ERKs via le VS.

† Il est à noter que les figures de ce chapitre proviennent d'un article scientifique dont les auteurs sont : Sanjay K. Pandey, *Jean-François Théberge*, Michel Bernier et Ashok K. Srivastava (Pandey 1999).



**Figure 4.5. L'effet d'un inhibiteur de la farnésylation de ras sur l'activation des ERKs par le sulfate de vanadyle.**<sup>†</sup> Les cellules CHO-HIR ont été pré-incubées avec ou sans B581 (50 et 100 μM), suivi d'une incubation avec ou sans insuline (100 nM) ou avec ou sans VS (100 μM) pendant 5 min. L'activité des ERKs a été dosée et sa quantification est la moyenne de trois expériences indépendantes (A). À partir des mêmes stimulations, la phosphorylation des deux résidus critiques pour l'activité des ERKs (Thr202/Tyr204) a été détectée par un immunobuvardage avec un anti-phosphospécifique-ERKs (B). Cette autoradiographie représente deux expériences indépendantes.

**CHAPITRE 5. L'ACTION INSULINOMIMÉTIQUE DU SULFATE DE  
VANADYLE SUR LA CASCADE DE SIGNALISATION DE L'INSULINE**

## 5.1 La signalisation de l'insuline

Il est maintenant clair que la PI3-k joue un rôle de premier plan dans la signalisation induite par le VS, comme par l'insuline. À la lumière de ces connaissances, nous nous sommes ensuite intéressé à l'action du VS dans le temps. En général, la transduction du signal est grandement influencée par la variation de l'activité enzymatique dans le temps. Ainsi, nous avons étudié l'effet temporel du VS sur le récepteur à l'insuline, IRS-1, la PI3-k, les ERKs et la PKB. En parallèle, nous avons effectué les mêmes expériences pour ce qui est de l'effet de l'insuline dans le temps.

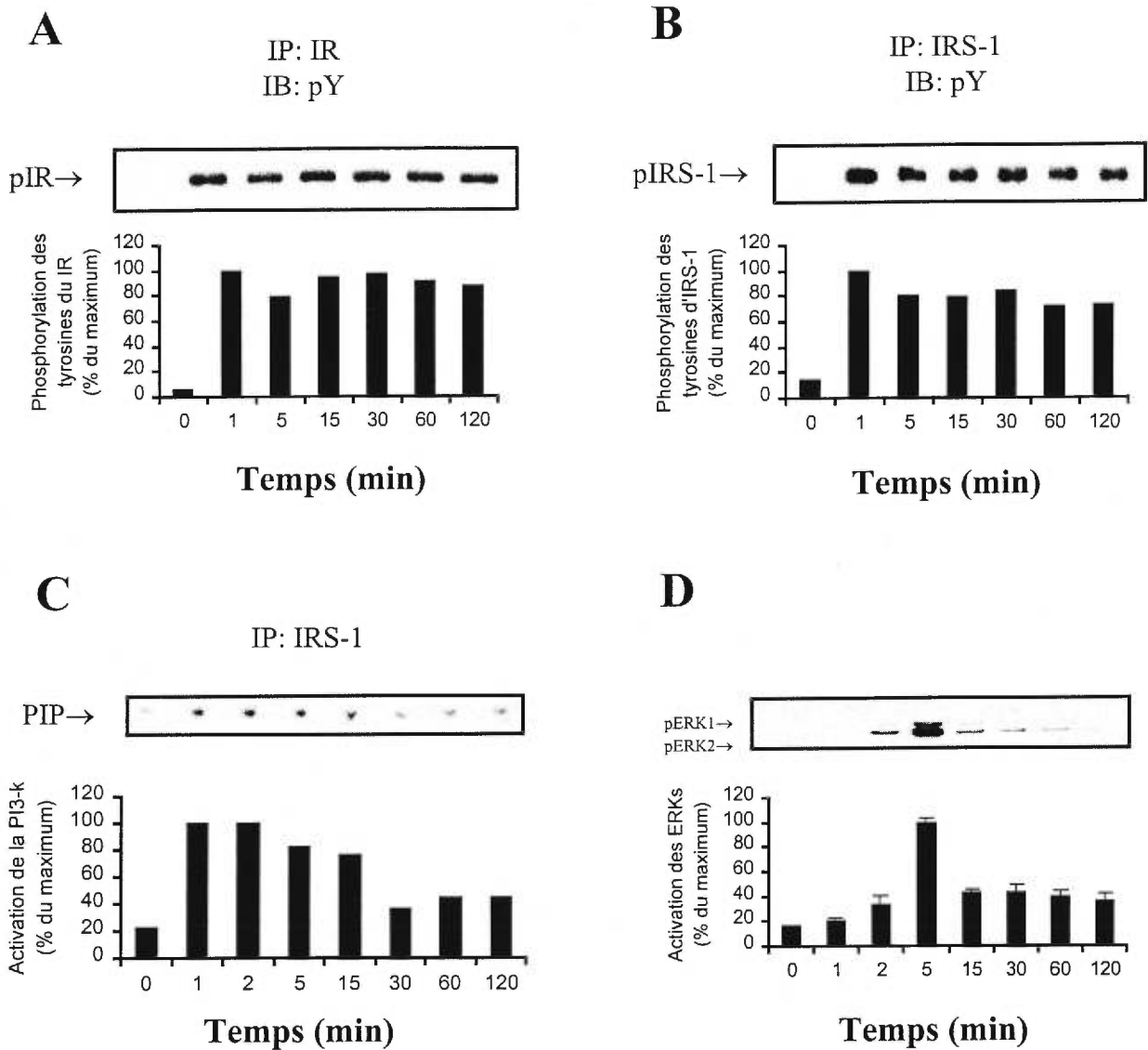
De plus, nous avons étudié l'effet du VS sur l'action temporelle de l'insuline au niveau des mêmes enzymes. Dans le but de pouvoir comparer les cinétiques de ces différentes enzymes, nous avons fait toutes ces expériences dans le même système et nous avons toujours stimulé les cellules CHO-HIR avec la même concentration d'insuline (100 nM) et de VS (100  $\mu$ M). Le choix de ces concentrations a été fait dans le but d'obtenir des signaux pour toutes les enzymes étudiées. Par ailleurs, ces concentrations sont très souvent utilisées dans des études similaires.

La signalisation de l'insuline est relativement bien connue par rapport à celle du VS et servira de contrôle dans les prochaines expériences. Dans cette partie du projet, nous avons procédé à l'analyse systématique des constituants de la cascade de signalisation de l'insuline en commençant par le récepteur à l'insuline et en suivant l'ordre normal d'activation de la cascade (IRS-1, PI3-k, ERKs et en parallèle, PKB). Tout d'abord, nous avons analysé l'effet de l'insuline sur la phosphorylation du récepteur à l'insuline et d'IRS-1 (figures 5.1 A et 5.1 B; page 56). Nos résultats démontrent que l'insuline (100 nM) induit une augmentation de la phosphorylation des tyrosines du récepteur et d'IRS-1 en moins d'une minute. Dans ces deux cas, cette phosphorylation est maintenue pendant au moins deux heures.

Par la suite, nous avons observé l'activation de la PI3-k par l'insuline (figure 5.1 C; page 56). Nos résultats démontrent que l'insuline (100 nM) active la PI3-k en moins d'une minute. Cette activation est transitoire et revient près du niveau basal après 15 minutes d'incubation et y reste jusqu'à deux heures d'incubation. Nous avons également observé l'effet de l'insuline (100 nM) sur l'activité et la phosphorylation des ERKs (figure 5.1 D; page 56). L'insuline provoque une augmentation de l'activité avec un maximum atteint en cinq minutes. Cette activation chute près du niveau basal en 15 minutes d'incubation. Ensuite, le niveau d'activité des ERKs demeure bas jusqu'à deux heures d'incubation. De façon similaire, nos résultats démontrent que l'insuline induit la même cinétique en ce qui a trait à la phosphorylation des résidus critiques des ERKs.

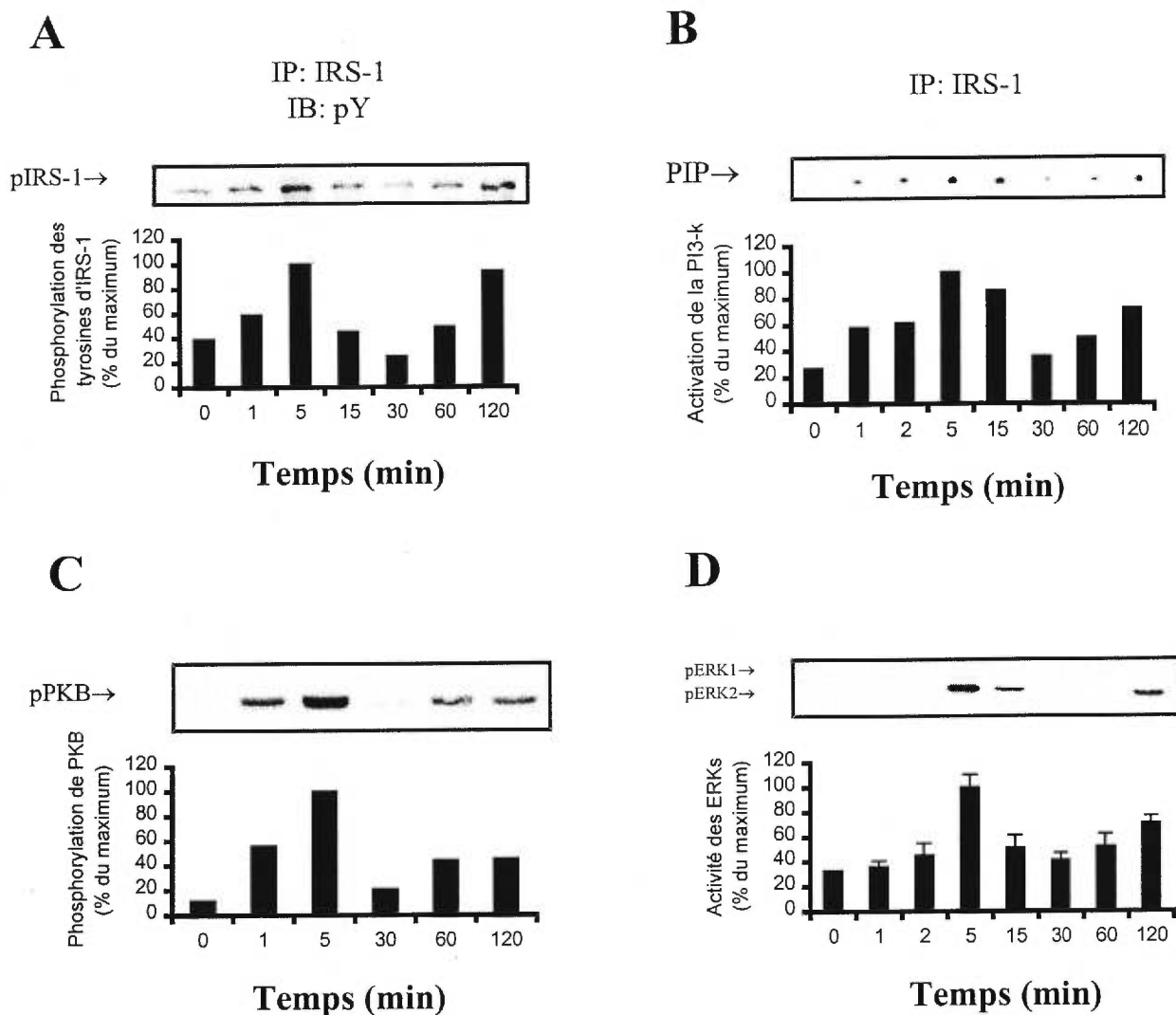
## **5.2 La signalisation du sulfate de vanadyle**

Le caractère intéressant du VS est qu'il induit des effets insulinomimétiques sans activation du récepteur à l'insuline (D'Onofrio 1994). Nous avons voulu vérifier cela en évaluant l'effet du VS (100  $\mu$ M) sur la phosphorylation des tyrosines du récepteur à l'insuline (résultats non montrés). Nos résultats démontrent que le VS ne provoque aucun effet significatif à ce niveau. Toutefois, nous avons pu détecter une faible augmentation de la phosphorylation des tyrosines d'IRS-1 induite par le VS (figure 5.2 A; page 57). L'analyse de la cinétique nous démontre une phosphorylation biphasique. En fait, le niveau maximum de phosphorylation est atteint en 5 minutes, il descend après 15 minutes et remonte après 60 min pour demeurer stable. Fait intéressant, nos résultats démontrent que le VS induit une cinétique similaire pour tous les autres composants de la cascade. Ainsi, que ce soit au niveau de l'activation de la PI3-k ou des ERKs ou la phosphorylation des ERKs et de la PKB, le VS induit la même activation biphasique (figures 5.2 B, 5.2 C et 5.2 D; page 57).



**Figure 5.1 La signalisation induite par l'insuline.** Des cellules CHO-HIR confluentes et privées de sérum pendant 15 heures, ont été traitées avec ou sans insuline (100 nM) pendant différents temps d'incubation (1, 2, 5, 15, 30, 60, 120 minutes). Les stimulations se sont terminées par le rinçage des pétris avec du tampon PBS froid et en les congelant dans l'azote liquide. Par la suite, les cellules ont été solubilisées et les lysats ont été utilisés. Les figures **A** et **B** montrent la phosphorylation des tyrosines du récepteur à l'insuline (IR) et d'IRS-1, respectivement. Nous avons fait un immunobuvardage (IB) avec un anti-phosphotyrosine (pY) précédée d'une immunoprécipitation (IP) du IR et d'IRS-1, respectivement. La figure **C** montre l'activité de la PI3-k par la phosphorylation des phosphatidyl inositol (PIP) précédée d'une IP d'IRS-1. Pour les figures **A**, **B** et **C**, la quantification de la phosphorylation est montrée. La figure **D** montre l'activation et la phosphorylation des ERKs. Nous avons procédé d'une part, à l'IB avec un anti-phosphospécifique-ERKs et d'autre part, à l'activité des ERKs. Tous les IB de même que les dosages d'activité sont représentatifs d'au moins trois expériences indépendantes.



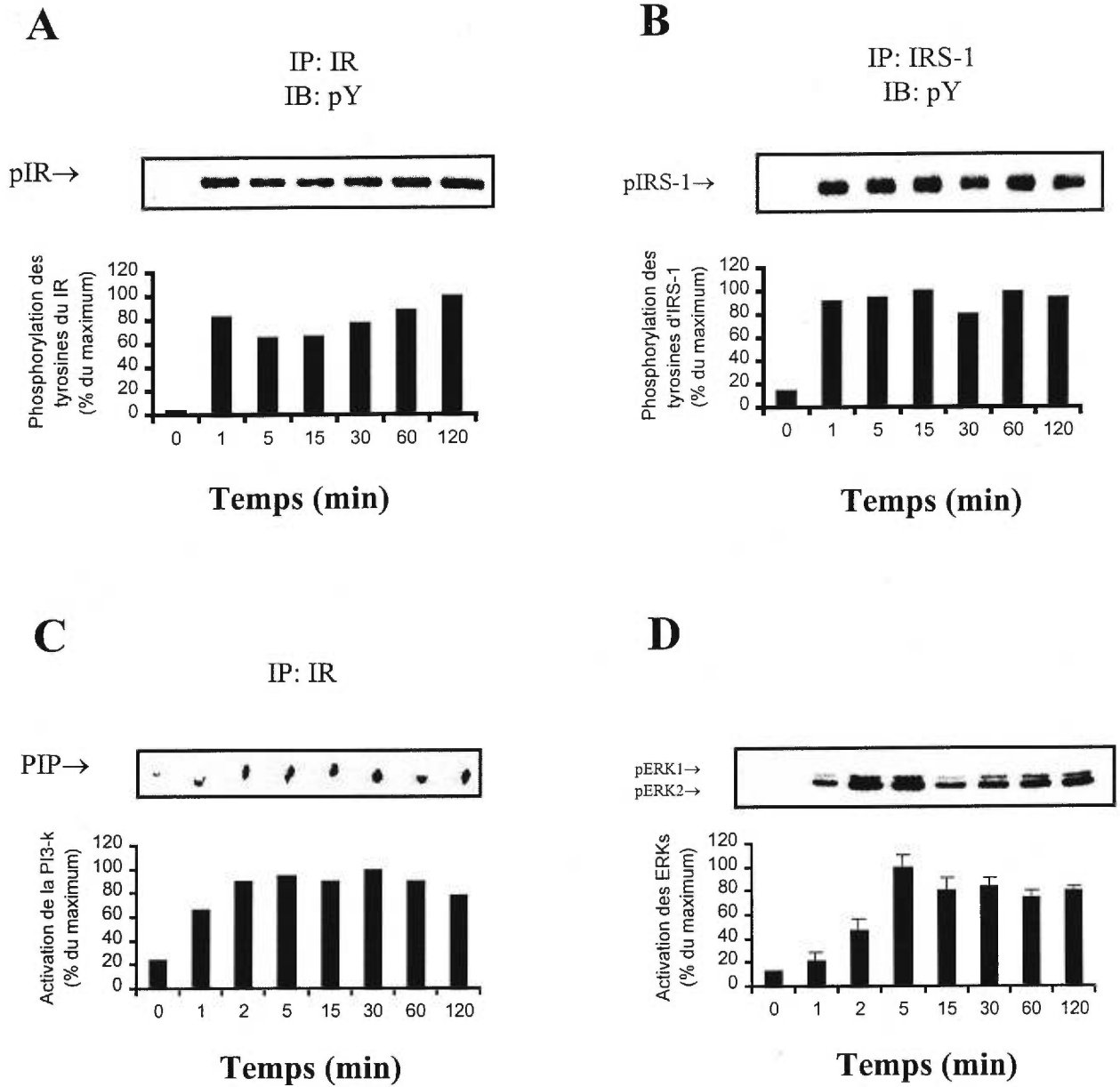


**Figure 5.2 La signalisation induite par le sulfate de vanadyde.** La méthode est la même que celle décrite à la figure précédente sauf que les stimulations ont été faites avec du VS (100  $\mu$ M). La figure A montre la phosphorylation des tyrosines d'IRS-1. Nous avons fait un IB avec un anti-pY précédée d'une IP d'IRS-1. La figure B montre l'activité de la PI3-k par la phosphorylation des PIP précédée d'une IP d'IRS-1. La figure C montre la phosphorylation de la sérine 473 de PKB. Nous avons fait un IB avec un anti-phosphospécifique-PKB. Pour les figures A, B et C, la quantification de la phosphorylation est montrée. La figure D montre la phosphorylation et l'activation des ERKs. Nous avons procédé d'une part, à l'IB avec un anti-phosphospécifique-ERKs et d'autre part, à l'activité des ERKs. Tous les IB de même que les dosages d'activité sont représentatifs d'au moins trois expériences indépendantes.

### 5.3 La modulation de la signalisation de l'insuline par le sulfate de vanadyle

Nous venons de démontrer que l'insuline et le VS activent les mêmes enzymes dans les cellules CHO-HIR, sauf le récepteur à l'insuline. Toutefois, il est connu que ces deux agents induisent leurs effets par différentes voies. Nous nous sommes donc intéressé à savoir si ces voies pourraient s'influencer. C'est pourquoi nous avons étudié la modulation de la signalisation de l'insuline par le VS. Tout d'abord, nous avons analysé l'effet du VS (100  $\mu$ M) sur l'action de l'insuline (100 nM) au niveau de la phosphorylation des tyrosines du récepteur à l'insuline et d'IRS-1 (figures 5.3 A et 5.3 B; page 59). Nos résultats démontrent qu'en présence de VS, l'insuline induit l'augmentation maximale de la phosphorylation des tyrosines du récepteur et d'IRS-1 en moins d'une minute. Dans ces deux cas, la phosphorylation est maintenue pendant au moins deux heures. Ainsi, nos résultats suggèrent que le VS n'influence pas vraiment la phosphorylation des tyrosines du récepteur et d'IRS-1, induite par l'insuline, dans le temps.

Par la suite, nous avons analysé l'effet d'une pré-incubation de 15 min avec du VS (100  $\mu$ M) sur l'action de l'insuline (100 nM) au niveau de l'activité de la PI3-k. Nos résultats démontrent qu'il y a activation de la PI3-k en moins d'une minute et que cette activation se maintient pendant au moins deux heures d'incubation (figure 5.3 C; page 59). Nous avons démontré la même cinétique pour l'activation des ERKs (figure 5.3 D; page 59). Nous avons, encore une fois, démontré que la cinétique d'activation des ERKs est la même que sa cinétique de phosphorylation. Ainsi, nos résultats suggèrent qu'en présence de VS, l'insuline active la PI3-k et les ERKs de façon soutenue et ce, pendant au moins deux heures. Comme l'insuline active ces enzymes de façon transitoire, nous suggérons donc que le VS prolonge l'action de l'insuline au niveau de la PI3-k et des ERKs dans les cellules CHO-HIR.

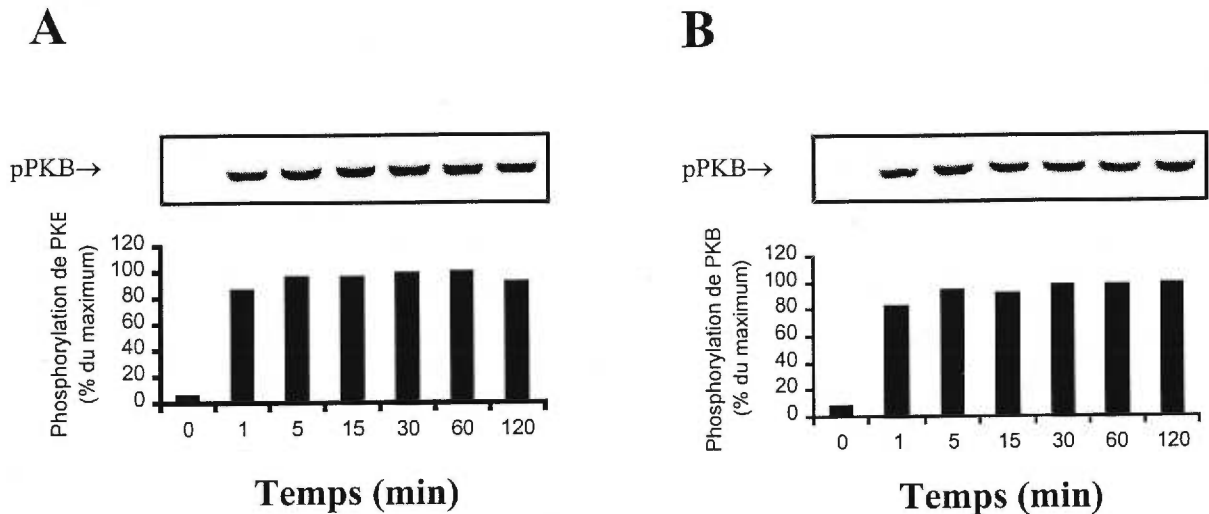


**Figure 5.3 La modulation de la signalisation de l'insuline par le sulfate de vanadyde.**

Cette figure montre l'effet du VS au niveau de l'action de l'insuline sur la phosphorylation des tyrosines du IR (A) et d'IRS-1 (B) ainsi que sur l'activité de la PI3-k (C) et des ERKs (D). Pour les ERKs, la phosphorylation de ses deux résidus critiques (tyrosine 204 et thréonine 202) est aussi détectée. La méthode est la même que celle décrite à la figure 5.1 (page 56) sauf que les stimulations avec l'insuline ont été précédées d'une incubation avec du VS (100  $\mu$ M) pendant 15 minutes. Tous les IB de même que les dosages d'activité sont représentatifs d'au moins trois expériences indépendantes.

## 5.4 La phosphorylation de la protéine kinase B

Il est bien connu que la PKB est activée par la PI3-k (Downward 1998). Ainsi, il est intéressant de comparer la cinétique d'activation de ces deux enzymes. Nous avons donc analysé l'effet de l'insuline (100 nM) en absence (figure 5.4 A) et en présence (figure 5.4 B) de VS (100  $\mu$ M) au niveau de la phosphorylation de la sérine 473 de la PKB. Dans ces deux cas, nous observons une augmentation rapide de la phosphorylation; le maximum est atteint en moins de d'une minute. De plus, ces niveaux de phosphorylation sont maintenus pendant au moins deux heures. Nos résultats suggèrent que le VS n'influence pas la phosphorylation de PKB induite par l'insuline.



**Figure 5.4 La phosphorylation de la protéine kinase B.** Cette figure montre l'effet de l'insuline, avec ou sans pré-incubation de VS (100  $\mu$ M) pendant 15 minutes, sur la phosphorylation de la sérine 473 de la PKB. La méthode est la même que celle décrite aux figures 5.1 et 5.5 (pages 56 et 59). La figure A montre l'effet d'une incubation avec de l'insuline (100 nM) et la figure B montre l'effet d'une pré-incubation du VS (100  $\mu$ M) sur la stimulation de l'insuline (100 nM). Les lysats ont été utilisés pour l'IB avec un anti-phosphospécifique-PKB. Tous ces IB sont représentatifs d'au moins trois expériences indépendantes.

**CHAPITRE 6. DISCUSSION ET CONCLUSIONS  
GÉNÉRALES**

### **6.1 Le rôle de la phosphatidyl inositol 3-kinase dans la signalisation du sulfate de vanadyle**

Le VS est un inhibiteur de PTPases. Cet effet a été démontré à maintes reprises au niveau des PTPases impliquées dans la régulation du récepteur à l'insuline et d'IRS-1 comme la PTP-1B, la LAR et la SHP-2 (Brichard 1990, Cohen 1995, Kolter 1997, Sekar 1996, Meyerovitch 1987, Meyerovitch 1991, Poucheret 1998, Ramanadham 1989). Il est également bien connu que le VS inhibe des PTPases impliquées dans la régulation des ERKs comme les MKP et la VHR (Cook 1997, Toff 99).

L'inhibition des PTPases crée un déséquilibre dans le niveau de phosphorylation des tyrosines favorisant une augmentation du niveau de phosphorylation des tyrosines de certaines protéines. Plusieurs évidences montrent que l'augmentation du niveau des tyrosines est souvent impliquée avec l'activation des effecteurs de la cascade de signalisation de l'insuline. La phosphorylation des tyrosines du récepteur à l'insuline est nécessaire et suffisante à son activation (D'onofrio 1994, Pandey 1998). La phosphorylation des tyrosines d'IRS-1 est nécessaire au recrutement et à l'activation de multiples effecteurs (Di Guglielmo 1998). La phosphorylation des tyrosines de la PI3-k est possiblement impliquée dans son activation (Hayashi 1993). La phosphorylation des tyrosines 340 et 341 de raf-1 est nécessaire à l'obtention son activité maximale (Morrison 1997). La phosphorylation d'une tyrosine des ERKs est primordiale pour son activité (Widmann 1999). De plus, la phosphorylation des tyrosines est aussi associée à l'inhibition de bloqueurs de la cascade de signalisation. En effet, la phosphorylation d'une tyrosine de PP2A semble inhiber temporairement son activité, permettant à ses substrats (MEK, PKB, ERK,...) de s'activer complètement (O'Brien 1996, Reusch 1995).

En déphosphorylant les tyrosines de protéines spécifiques, les PTPases sont impliquées dans de nombreuses régulations à la baisse de la cascade de

signalisation de l'insuline. En tant qu'inhibiteur de PTPases, le VS pourrait potentiellement agir partout dans la cascade. En théorie, il pourrait augmenter le niveau de phosphorylation des tyrosines de multiples protéines soit par l'inhibition directe de PTPases ou indirectement par l'activation de certaines enzymes de la cascade. En pratique, nous savons déjà que le VS active presque la totalité des composants de la cascade de signalisation de l'insuline. Cependant, nous ne comprenons pas encore très bien les mécanismes impliqués.

Nos recherches ont démontré pour la première fois que, dans un même système, l'activation de ras, raf-1, MEKs et ERKs par le VS est complètement inhibée par la wortmannin (figures 4.1, 4.2 et 4.3; pages 44, 46 et 48). La wortmannin est un inhibiteur très puissant et spécifique de la PI3-k lorsque sa concentration est de l'ordre du nanomolaire (Srivastava 1998). Cela suggère que l'activation de la cascade des ERKs par le VS dépend de la PI3-k. Donc, cela pose un sérieux doute sur toutes les hypothèses précédentes et suggère fortement que le champ d'action du VS se situe au niveau de la PI3-k ou en amont.

Il est connu que la PI3-k peut transmettre des signaux à la voie de ras/ERKs de façon dépendante ou indépendante du récepteur à l'insuline. En effet, il a été démontré qu'une forme constitutivement active de la PI3-k peut induire des effets de façon dépendante de ras et indépendante du récepteur à l'insuline (Hu 1995). Il est également connu que la PKC $\zeta$  est souvent impliquée dans la régulation de la voie des ERKs par la PI3-k (Sajan 1999). Dans une autre étude, il a été démontré que la PI3-k agit en amont de ras dans la signalisation de l'insuline vis-à-vis la transcription de c-fos (Yamauchi 1993).

Il est connu depuis longtemps que la PI3-k interagit avec ras (Sjolander 1991). Cette interaction physique est commune pour les PI3-k de classe IA et IB. Dans les deux cas, ras doit lier le GTP pour pouvoir interagir. Toutefois, il semble que la classe IA soit plus sensible à cette interaction (Wymann 1998). Par contre, l'action de la PI3-k sur l'activité de ras est mal caractérisée. Il existe une

controverse à savoir si la PI3-k active ras ou l'inverse (Feig 1994). Nous avons approfondi ces études dans les cellules CHO-HIR. Tout d'abord, nous avons confirmé que dans notre modèle cellulaire, la PI3-k interagit avec ras, en réponse à l'insuline et au VS. Pour ce faire, nous avons immunoprécipité la PI3-k avec un anti-ras pour doser son activité (figure 4.4; page 50). Par la suite, nous avons démontré la nécessité de la présence de ras dans l'activation des ERKs induite par le VS. En effet, nous avons observé une inhibition de l'activité des ERKs, induite par le VS, en présence d'un inhibiteur de la farnésylation, B581 (figure 4.5; page 52). Comme la farnésylation est nécessaire à l'activation de ras, ceci démontre la nécessité de ras dans l'action du VS au niveau de la cascade des ERKs (Seabra 1998). Toutefois, la farnésylation est un phénomène qui concerne plusieurs autres enzymes, certaines pouvant être impliquées dans la voie des ERKs. C'est le cas des protéines G $\beta\gamma$ . En effet, il est bien connu que plusieurs protéines G couplées à des récepteurs engendrent de nombreuses voies convergeant vers les ERKs (Morris 1999). Des études suggèrent que c-raf pourrait jouer le rôle d'intermédiaire dans cette voie d'activation (Slusky 1999). De plus, la farnésylation de ces protéines G est critique pour leur ancrage à la membrane et pour leur interaction avec d'autres protéines (Myung 1999). Par conséquent, il est possible que l'effet de B581 puisse affecter l'intégrité de certaines protéines G, quoique leur rôle à jouer dans la cascade de signalisation de l'insuline reste à être plus fermement établi.

Maintenant, nous venons de démontrer que l'activation de ras par le VS dépend de la PI3-k et que ras est nécessaire à l'activation des ERKs par le VS. Cela suggère que, le VS active les ERKs via ras mais le tout de façon dépendante de la PI3-k. Cela suppose que la voie PI3-k/ras permet au VS d'activer la cascade des ERKs.

## **6.2. La signalisation de l'insuline**

Les variations d'activité enzymatique dans le temps sont très déterminantes pour l'obtention d'une réponse précise (Schramek 1996). Dans le



but d'approfondir le mécanisme d'action du VS, et plus précisément le rôle de la PI3-k, il est impératif d'étudier les cinétiques enzymatiques.

Dans d'autres lignées cellulaires, il a été démontré que l'insuline induit une phosphorylation transitoire du récepteur à l'insuline (Drake 1998). Toutefois, les cellules CHO-HIR surexpriment le récepteur à l'insuline et ceci leur confère une plus grande sensibilité à l'insuline. Cela pourrait être la cause de l'observation d'une phosphorylation soutenue du récepteur en réponse à l'insuline (figure 5.1 A; page 56). De plus, cette surexpression crée nécessairement un déséquilibre dans les proportions entre le nombre de récepteurs vis-à-vis leurs substrats, favorisant de loin les récepteurs. Ainsi, il est normal de constater que les récepteurs qui sont phosphorylés de façon soutenue par l'insuline, induisent la phosphorylation d'IRS-1 de façon soutenue (figures 5.1 A et 5.1 B; page 56). D'ailleurs, des résultats similaires ont aussi été obtenus à des concentrations d'insuline plus faible, soit respectivement 0.1 nM d'insuline pour le récepteur et 10 nM pour IRS-1 (résultats non montrés).

Dans la signalisation de l'insuline, il est connu que l'activation de la PI3-k nécessite la phosphorylation des tyrosines d'IRS-1 (Virkamäki 1999). Pour la première fois dans la littérature, nous avons démontré une baisse rapide de l'activité de la PI3-k en réponse à l'insuline (figure 5.1 C; page 56), malgré qu'IRS-1 reste phosphorylé de façon soutenue (figure 5.1 B; page 56). Ceci suggère l'intervention de nombreux mécanismes de régulation à la baisse de son activité qui sont indépendants de la phosphorylation des tyrosines d'IRS-1. Par exemple, l'autophosphorylation de la PI3-k ou le bris de la liaison PI3-k-IRS-1 par les produits de la PI3-k (PIP3) sont des mécanismes potentiels de régulation à la baisse de l'activité de la PI3-k (Rameh 1995, Vanhaesebroeck 1999). La phosphorylation des sérines/thréonines d'IRS-1 pourrait aussi jouer un rôle puisqu'il est connu qu'elle peut changer la conformation d'IRS-1. Il a été démontré que la PKB peut rendre IRS-1 insensible à l'action des PTPases en le phosphorylant sur des sérines (Paz 1999, Qiao 1999). Puisqu'on observe une

phosphorylation soutenue de la PKB en réponse à l'insuline (figure 5.4 A; page 60), il est donc possible que la PKB induise un changement de conformation d'IRS-1 empêchant ainsi sa déphosphorylation et perturbant sa liaison avec la PI3-k. Ceci pourrait expliquer l'activation transitoire de la PI3-k.

Fait intéressant, on observe la même baisse d'activité induite par l'insuline au niveau des ERKs. La régulation de l'activité des ERKs dépend de l'équilibre entre ses kinases (les MEKs) et ses phosphatases. Il est connu que la PI3-k peut transmettre ses signaux à la cascade des ERKs et nous avons démontré que, dans les cellules CHO-HIR, ces signaux passent via ras. Il est donc possible que la chute d'activité de la PI3-k contribue à l'arrêt de l'activation de la cascade des ERKs. Jusqu'à ce jour, personne n'a démontré que l'insuline induit des cinétiques très bien corrélées entre la PI3-k et les ERKs. Toutefois, l'arrêt de l'activation de la cascade des ERKs peut être aussi du à la dissociation de sos et Grb-2 induit par l'hyperphosphorylation de sos ou encore par la rétrophosphorylation des effecteurs en amont des ERKs (Zhao 1998, Waters 1995).

Par contre, même si la cascade des ERKs a cessé d'être activée, cela n'empêche pas les ERKs de demeurer phosphorylées. Il faut absolument des phosphatases pour déphosphoryler et désactiver les ERKs. Puisqu'on observe une déphosphorylation en moins de 15 minutes des ERKs (figure 5.1 D; page 56), il est très peu probable que les MKP, absentes à l'état basal et transcriptes suite à une stimulation mitogénique, puissent être responsables de cette déphosphorylation. De plus, nous avons obtenu des résultats similaires en présence d'un inhibiteur de la transcription (actinomycine D) ou d'un inhibiteur de la traduction (cycloheximide) (résultats non montrés). Il est plutôt probable que cette déphosphorylation rapide soit attribuable à des phosphatases exprimées de façon constitutive. Il est donc possible que la PP2A et la PTPase VHR soient responsables, respectivement, de la déphosphorylation des ERKs dans le cytoplasme et le noyau (figure 3.1; page 30).

Il est bien connu que les ERKs doivent être phosphorylés sur la thréonine 202 et la tyrosine 204 pour être activés. Nous avons confirmé le rôle de ces phosphorylations en comparant leur niveau avec le niveau d'activité des ERKs dans les mêmes conditions. Dans tous les cas, nos résultats ont démontré une très bonne corrélation (figures 5.1 D, 5.2 D et 5.3 D; page 56).

### **6.3. La signalisation du sulfate de vanadyle**

Nos résultats ont démontré que le VS ne provoquait aucune phosphorylation des tyrosines du récepteur à l'insuline dans le temps. Ceci confirme l'hypothèse de notre laboratoire (D'onofrio 1994, Pandey 1998). Par contre, nous avons démontré que le VS induit une faible augmentation biphasique de la phosphorylation des tyrosines d'IRS-1. La même cinétique fut également détectée pour l'activation de la PI3-k et des ERKs et pour la phosphorylation de la PKB. Nos résultats démontrent, pour la première fois, une vague d'activation biphasique touchant les constituants majeurs de la cascade de signalisation de l'insuline. Ces résultats concrétisent d'avantage le rôle de la phosphorylation des tyrosines d'IRS-1 et l'activité de la PI3-k dans l'activation de la cascade des ERKs en réponse au VS (Pandey 1998, 1999). Le mécanisme par lequel VS augmente la phosphorylation des tyrosines d'IRS-1 est inconnu. Toutefois, il est possible que le VS induise l'inhibition de PTPases spécifiques à IRS-1 (figure 3.1; page 30). Il est aussi possible que le VS active une kinase de tyrosine cytoplasmique, mais cela reste à être confirmé (Sekar 1999).

Il est également possible que le VS active les ERKs en inhibant des PTPases qui leurs sont spécifiques. Cependant, beaucoup d'évidences vont contre cette idée. En effet, nous avons démontré que la wortmannin bloque l'activation des ERKs par le VS (figure 4.3; page 48). De plus, la grande similitude entre toutes les cinétiques étudiées suggèrent que le VS agit sur toute la cascade via IRS-1 et que la cinétique observée pour IRS-1 pourrait se transposer sur les autres composants de la cascade. Ces résultats renforcent notre hypothèse suggérant que

le VS active les ERKs via la PI3-k et ras. Toutefois, on observe une baisse de la phosphorylation des ERKs qui ne peut pas être seulement due à l'arrêt de l'activation de la cascade. Cependant, elle peut être due à l'action de phosphatases moins sensibles au VS comme la PP2A.

Il a été suggéré que le vanadate pourrait s'oxyder en pervanadate après quelques heures dans le milieu de culture (Sekar 1996). Ceci pourrait expliquer pourquoi l'activité et la phosphorylation de toutes les enzymes étudiées était si élevées après une ou deux heures de stimulation avec le VS (figures 5.2 A, 5.2 B, 5.2 C et 5.2D; page 57). Le pervanadate est formé par une combinaison entre le peroxyde d'hydrogène et le vanadate. Le pervanadate est un inhibiteur de PTPases beaucoup plus puissant que le vanadate (D'onofrio 1994). Si le pervanadate est vraiment formé dans nos cellules, il pourrait être à l'origine du retour d'activité lors des cinétiques biphasiques. D'ailleurs, nous avons déjà observé que certains anti-oxidants pouvaient contrer l'activation des ERKs par le VS (résultats non montrés).

#### **6.4. La modulation de la signalisation de l'insuline par le sulfate de vanadyle**

Nos résultats montrent que l'insuline provoque une phosphorylation soutenue du récepteur à l'insuline et d'IRS-1 dans le temps (figures 5.1 A, 5.1 B; page 56). Nous nous sommes donc intéressé à étudier l'effet d'une pré-incubation avec le VS à ces niveaux. Nos résultats démontrent qu'en présence de VS, l'insuline induit des cinétiques de phosphorylation similaires au niveau du récepteur et d'IRS-1 (figures 5.3 A et B; page 59). Par conséquent, nous ne sommes pas aptes à démontrer l'effet du VS sur l'action de l'insuline au niveau du récepteur et d'IRS-1 dans ces cellules.

Fait intéressant, nous avons démontré que le VS pouvait bloquer la désactivation de la PI3-k induite normalement par l'insuline et il en est de même pour les ERKs (figure 3 C et D; page 59). Dans ces conditions, il se peut que le

VS bloque le ou les mécanisme(s) d'inhibition de l'activité de la PI3-k indépendant(s) de la phosphorylation des tyrosines d'IRS-1. Il a été démontré qu'il existe une PTPase spécifique aux ERKs qui est exprimée constitutivement dans le noyau, la VHR (Todd 1999). Il est connu que les ERKs sont transloquées dans le noyau après leur activation (Bokemeyer 1996, Widmann 1999). Par conséquent, il y a des chances que le VS bloque la désactivation des ERKs, induite par l'insuline, en inhibant une PTPase nucléaire (figure 3.1; page 30).

En accord avec le rôle prépondérant de la PI3-k dans la signalisation du VS, nos résultats suggèrent que la prolongation de l'activité de la PI3-k pourrait contribuer à la prolongation de l'activité des ERKs. Ceci caractérise d'avantage le rôle de la PI3-k au niveau de la régulation de la voie des ERKs. De plus, la prolongation de l'activité de la PI3-k s'avère être d'une grande importance en ce qui a trait à l'augmentation de la signalisation de l'insuline. Ultérieurement, ceci pourrait avoir des conséquences dans l'élaboration d'agents thérapeutiques, à base de vanadium, contre la résistance à l'insuline.

### **6.5. La phosphorylation de la protéine kinase B**

La phosphorylation de la thréonine 308 et de la sérine 473 de la PKB est requise pour l'obtention de son activité. Nous avons considéré la phosphorylation de la sérine 473 de la PKB comme un indice de son activité. De plus, il a été suggéré que cette phosphorylation est probablement subséquente à l'autre phosphorylation (thréonine 308) nécessaire à son activation (Toker, sous presse).

Il est bien connu que la PKB est activée par les produits de la PI3-k (PIP<sub>2</sub> et PIP<sub>3</sub>) (Coffer 1998, Walker 1998). Pourtant, nos résultats ont démontré une phosphorylation soutenue de l'enzyme en réponse à l'insuline (figure 5.4 A; page 60), même si l'activité de la PI3-k chute après 15 minutes d'incubation (figure 5.1 C; page 60). Ceci pourrait potentiellement s'expliquer par le métabolisme des produits de la PI3-k induit par l'insuline. Dans les cellules CHO-HIR, il a été

démontré que l'insuline active la PI3-k de façon transitoire tout en maintenant élevé le niveau de PIP<sub>3</sub> formé pendant au moins deux heures (Ruderman 1990). Ceci est probablement un artéfact spécifique de ces cellules dû à la surexpression du récepteur à l'insuline. Pour essayer de contourner ce problème, nous avons stimulé nos cellules avec une concentration d'insuline plus faible (0,01 nM; résultats pas présentés) mais nous avons obtenu la même cinétique. Comme il existe d'autres voies de signalisation pouvant activer la PKB, il se peut que le récepteur à l'insuline active la PKB par des voies indépendantes de la PI3-k mais totalement inconnues à ce jour (Coffer 1998 et Walker 1998).

## 6.6. Conclusions et perspectives

Cette étude nous a permis d'approfondir le mécanisme d'action insulinomimétique du VS. Nos résultats suggèrent un mécanisme potentiel pour l'action des sels de vanadium. En effet, nos résultats suggèrent que le VS active la voie des ERKs via ras et ce, de façon dépendante à la PI3-k. De plus, nous avons confirmé cette hypothèse en analysant l'action temporelle du VS sur la cascade de signalisation de l'insuline. Aussi, nous avons démontré que le VS pouvait prolonger l'activation de la PI3-k et des ERKs, induite par l'insuline.

Même si nous avons souligné le rôle prépondérant de la PI3-k dans l'action du vanadium, il reste beaucoup à connaître sur sa régulation, ses implications et son mode d'action. Nos prochaines recherches porteront sur le rôle de la PTP-1B et de SYP sur l'action de l'insuline et des sels de vanadium. De plus, nous voulons en savoir plus sur "l'effet à retardement" induit par le VS au niveau de la cascade de signalisation de l'insuline. Pour cela, nous allons étudier les niveaux d'expression de certaines MKPs. Ainsi, l'identification des PTPases potentiellement impliquées dans le mode d'action du VS demeure notre priorité puisqu'elle est cruciale pour une meilleure compréhension du mécanisme d'action insulinomimétique des sels de vanadium.

## BIBLIOGRAPHIE

**Ahmad, F., J.L. Azevedo, R. Cortright, G.L. Dohm, B.J. Goldstein,** *Alteration in skeletal muscle protein-tyrosine phosphatase activity and expression in insulin-resistant human obesity and diabetes*, J. Clin. Invest., (1997), **100**, 449-458.

**Ahmad, F., B.J. Goldstein,** *Alteration in specific protein-tyrosine phosphatases accompany insulin resistance of streptozotocin diabetes*, Am. J. Physiol., (1995), **268**, E932-E940.

**Alessi, D.R., C.P. Downes,** *The rôle of PI 3-kinase in insulin action*, Biochimica et Biophysica Acta, (1998), **1436**, 151-164.

**Badmaev, V., S. Prakash, M. Majeed,** *Vanadium : A review of its potentiel rôle in the fight against diabetes*, The J. Altern. Compl. Med., (1999), **5**, 273-291.

**Barceloux, D.G.,** *Vanadium*, Clin. Tox., (1999), **37**, 265-278.

**Bleyle, L.A., Y. Peng, C. Ellis, R.A. Mooney,** *Dissociation of PTPase levels from their modulation of insulin receptor signal transduction*, Cell Signal, (1999), **11**, 719-725.

**Bokemeyer, D., A. Sorokin, M.J. Dunn,** *Multiple intracellular MAP kinase signaling cascades*, Kidney International, (1996), **49**, 1187-1198.

**Bondeva, T., L. Pirola, G. Bulgarelli-Leva, I. Rubio, R. Wetzker, M.P. Wymann,** *Bifurcation of lipid and protein kinase signals of PI3K $\gamma$  to the protein kinases PKB and MAPK*, Science, (1998), **282**, 293-296.

**Brichard, S.M., J.B. Clifford, J.C. Henquin,** *Marked improvement of glucose homeostasis in diabetic ob/ob mice given oral vanadate*, *Diabetes*, (1990), **39**, 1326-1332.

**Brondello, J.M., A. Brunet, J. Pouyssegur, F.R. McKenzie,** *The dual specificity mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 and 2 are induced by the p42/p44MAPK cascade*, *J. Biol. Chem.*, (1997), **272**, 1368-1376.

**Brunet, A., G. Pagès, J. Pouyssegur,** *Growth factor-stimulated MAP kinase induces rapid retrophosphorylation and inhibition of MAP kinase kinase (MEK1)*, *FEBS Letters*, (1994), **346**, 299-303.

**Bruning, J.C., M.D. Michael, J.N. Winnay, T. Hayashi, D. Horsch, D. Accili, L.J. Goodyear, C.R. Kahn,** *A muscle-specific insulin receptor knockour exhibits features of the metabolic syndrome of NIDDM without altering glucose tolerance*, *Mol. Cell.*, (1998), **2**, 559-569.

**Carlsen, J., K. Christiansen, J. Vinten,** *Insulin stimulated glycogen synthesis in isolated rat hepatocytes: effect of protein kinase inhibitors*, *Cell signal*, (1997), **9**, 447-50.

**Cass, L.A., S.A Summers, G.V. Prendergast, J.M. Backer, M.J. Birnbaum, J.L. Meinkoth,** *Protein kinase A-dependent and -independent signaling pathways contribute to cyclic AMP-stimulated proliferation*, *Mol. Cell. Biol.*, (1999), **19**, 5882-5891.

**Ceresa, B.P., J.E. Pessin,** *Insulin regulation of the Ras activation/inactivation cycle*, *Mol. Cell. Biochem.*, (1998), **182**, 23-29.



**Chajry, N., P.M. Martin, C. Cochet, Y. Berthois,** *Regulation of p42 mitogen-activated protein kinase activity by protein phosphatase 2A under conditions of growth inhibition by epidermal growth factor in A431 cells*, Eur. J. Biochem., (1996), **235**, 97-102.

**Cheatham, B., C.R. Kahn,** *Insulin action and the insulin signaling network*, Endocrine Rev., (1995), **16**, 117-142.

**Chen, J., S. Parsons, D.L. Brautigan,** *Tyrosine phosphorylation of protein phosphatase 2A in response to growth stimulation and v-src transformation of fibroblasts*, J. Biol. Chem., (1994), **269**, 7957-7962.

**Cherniack, A.D., J.K. Klarlund, B.R. Conway, M.P. Czech,** *Disassembly of Son-of-sevenless protein from Grb-2 during p21ras desensibilization by insulin*, J. Biol. Chem., (1995), **270**, 1485-1488.

**Cheung, A., J. Kusari, D. Jansen, D. Bandyopadhyay, A. Kusari, M. Bryer-Ash,** *Marked impairment of protein tyrosine phosphatase 1B activity in adipose tissue of obese subjects with and without type 2 diabetes mellitus*, J. Lab. Clin. Med., (1999), **134**, 115-123.

**Chin, J.E., F. Liu, R.A. Roth,** *Activation of protein kinase C $\alpha$  inhibits insulin-stimulated tyrosine phosphorylation of insulin receptor substrate-1*, Mol. Endo., (1994), **8**, 51-58.

**Coffer, P.J., J. Jin, J.R. Woodgett,** *Protein kinase B (c-Akt) : a multifunctional mediator of phosphatidylinositol 3-kinase activation*, Biochem. J., (1998), **335**, 1-13.

**Cohen, N., M. Halberstam, P. Shlimovich, C.J. Chang, H. Shamon, L. Rossetti,** *Oral vanadyl sulfate improves hepatic and peripheral insulin sensitivity in patient with Non-insulin-dependent diabetes mellitus*, *J. Clin. Invest.*, (1995), **95**, 2501-2509.

**Cook, S.J., J. Beltman, K.A. Cadwallader, M. McMahon, F. McCormick,** *Regulation of mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 expression by extracellular signal-related kinase-dependent and Ca<sup>2+</sup>-dependent signal pathways in rat-1 cells*, *J. Biol. Chem.*, (1997), **272**, 13309-13319.

**Corbalan-Garcia, S., S.S. Yang, K.R. Degenhardt, D. Bar-Sagi,** *Identification of the mitogen-activated protein kinase phosphorylation site on human Sos1 that regulate interaction with Grb2*, *Mol. Cell. Biol.*, (1996), **16**, 5674-5682.

**Cross, D.A., D.R. Alessi, J.R. Vandenheede, H.E. McDowell, H.S. Hundal, P. Cohen,** *The inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin or insulin-like growth factor 1 in the rat skeletal muscle cell line L6 is blocked by wortmannin, but not by rapamycin: evidence that wortmannin blocks activation of the mitogen-activated protein kinase pathway in L6 cells between Ras and Raf*, *Biochem. J.*, (1994), **303**, 21-26.

**Currie, R.A., K.S. Walker, A. Gray, M. Deak, A. Casamayor, C.P. Downes, P. Cohen, D.R. Alessi, J. Lucocq,** *Role of phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate in regulating the activity and localization of 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1*, *Biochem. J.*, (1999), **337**, 575-583.

**De Fea, K., R.A. Roth,** *Modulation of insulin receptor substrate-1 tyrosine phosphorylation and function by mitogen-activated protein kinase*, *J. Biol. Chem.*, (1997a), **272**, 31400-31406.

**De Fea, K., R.A. Roth,** *Protein kinase C modulation of insulin receptor substrate-1 tyrosine phosphorylation requires serine 612*, *Biochemistry*, (1997b), **36**, 12939-12947.

**De Rooij, J., J.L. Bos,** *Minimal Ras-binding domain of Raf1 can be used as an activation-specific probe for Ras*, *Oncogene*, (1997), **14**, 623-625.

**Dent, P., T. Jelinek, D.K. Morrison, M.J. Weber, T.W. Sturgill,** *Reversal of Raf-1 activation by purified and membrane-associated protein phosphatases*, *Science*, (1995), **268**, 1902-1905.

**Dhand, R. I. Hiles, G. Panayotou, S. Roche, M.J. Fry, I. Goût, N.F. Totty, O. Truong, P. Vicendo, K. Yonezawa, M. Kasuga, S.A. Courtneidge, M.D. Waterfield,** *PI 3-kinase is a dual specificity enzyme: autoregulation by an intrinsic protein-serine kinase activity*, *The EMBO Journal*, (1994), **13**, 522-533.

**Di Guglielmo, G.M., P.G. Drake, P.C. Baass, F. Authier, B.I. Posner, J.J.M. Bergeron,** *Insulin receptor internalisation and signaling*, *Mol. Cell. Biochem.*, (1998), **182**, 59-63.

**D'Onofrio, F., M.Q. Le, J.L. Chiasson, A.K. Srivastava,** *Activation of mitogen activated protein (MAP) kinases by vanadate is independent of insulin receptor autophosphorylation*, *FEBS Lett.*, (1994), **340**, 269-75.

**Downward, J.,** *Mechanism and consequences of activation of protein kinase B/AKT*, *Curr. Opin. Cell. Bio.*, (1998), **10**, 262-267.

**Drake, P.G., B.I. Posner,** *Insulin receptor-associated protein tyrosine phosphatase(s): Role in insulin action*, *Mol. Cell. Biochem.*, (1998), **182**, 79-89.

**Douville, E., J. Downward,** *EGF induced SOS phosphorylation in PC12 cells involves P90 RSK-2*, *Oncogene*, (1997), **14**, 376-381.

**Duff, J.L., B.P. Monia, B.C. Berk,** *Mitogen-activated protein (MAP) kinase is regulated by the MAP kinase phosphatase (MKP-1) in vascular smooth muscle cells*, *J. Biol. Chem.*, (1995), **270**, 7161-7166.

**Elchebly, M., P. Payette, E. Michaliszyn, W. Cromlish, S. Collins, A.L. Loy, D. Normandin, A. Cheng, J. Himms-Hagen, C.C. Chan, C. Ramachandran, M.J. Gresser, M.L. Tremblay, B.P. Kennedy,** *Increased insulin sensitivity and resistance in mice lacking the protein tyrosine phosphatase-1B gene*, *Science*, (1999), **283**, 1544-1548.

**Eldar-Finkelman, H., E.G. Krebs,** *Phosphorylation of insulin receptor substrate 1 by glycogen synthase kinase 3 impairs insulin action*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, (1997), **94**, 9660-9664.

**Elion, E.A.,** *Routing MAP kinase cascades*, *Science*, (1998), **281**, 1625-1626.

**Fantin, V.R., B.E. Lavan, Q. Wang, N.A. Jenkins, D.J. Gilbert, N.G. Copeland, S.R. Keller, G.E. Lienhard,** *Cloning, tissue expression, and chromosomal location of the mouse insulin receptor substrate 4 gene*, *Endo*, (1999), **140**, 1329-1337.

**Fauman, E.B., M.A. Saper,** *Structure and function of the protein tyrosine phosphatases*, *TiBS*, (1996), **21**, 413-417.

**Faux, M.C., J.D. Scott,** *More on target with protein phosphorylation: conferring specificity by location*, *TiBS*, (1996), **21**, 312-315.

**Feig, L.A., B. Schaffhausen,** *Signal transduction. The hunt for Ras targets,* Nature, (1994), **370**, 508-509.

**Feinstein, R., H. Kanety, M.Z. Papa, B. Lunenfeld, A. Karasik,** *Tumor necrosis factor- $\alpha$  suppresses insulin-induced tyrosine phosphorylation of insulin receptor and its substrates,* J. Biol. Chem., (1993), **268**, 26055-26058.

**Ferber, D.,** *New clues found to diabetes and obesity,* Science, (1999), **283**, 1423-1425.

**Frangioni, J.V., P.H. Beahm, V. Shifrin, C.A. Jost, B.G. Neel,** *The nontransmembrane tyrosine phosphatase PTP-1B localizes to the endoplasmic reticulum via its 35 amino acid C-terminal sequence,* Cell, (1992), **68**, 545-560.

**Franklin, C.C., A.S. Kraft,** *Conditional expression of the mitogen-activated protein kinase (MAPK) Phosphatase MKP-1 preferentially inhibits p38 MAPK and stress-activated protein kinase in U937 cells,* J. Biol. Chem., (1997), **272**, 16917-16923.

**Frodin, M., S. Gammeltoft,** *Rôle and regulation of 90 kDa ribosomal S6 kinase (RSK) in signal transduction,* Mol. Cell. Endo., (1999), **151**, 65-77.

**Fruman, D.A., R.E. Meyers, L.C. Cantley,** *Phosphoinositide kinase,* Annu. Rev. Biochem., (1998), **67**, 481-507.

**Garrington, T.P., G.L. Johnson,** *Organisation and regulation of mitogen-activated protein kinase signaling pathways,* Curr. Opin. Cell. Biol., (1999), **11**, 211-218.

**Goalstone, M.L., B. Draznin,** *What does insulin do to Ras?* Cell Signal, (1998), **10**, 297-301.

**Goldstein, B.J.**, *Regulation of insulin receptor signaling by protein-tyrosine dephosphorylation*, *Receptor*, (1993), **3**, 1-11.

**Goldstein, B.J., F. Ahmad, W. Ding, P.M. Li, W.R. Zhang**, *Regulation of the insulin signaling pathway by cellular protein-tyrosine-phosphatases*, *Mol. Cell. Biochem.*, (1998), **182**, 91-99.

**Haring, H.U., M. Kasuga, M.F. White, M. Crettaz, C.R. Kahn**, *Phosphorylation and dephosphorylation of insulin receptor : Evidence against an intrinsic phosphatase activity*, *Biochemistry*, (1984), **23**, 3298-3306.

**Hayashi, H., S. Kamohara, Y. Nishioka, F. Kanai, N. Miyake, Y. Fukui, F. Shibasaki, T. Takenawa, Y. Ebina**, *Insulin treatment stimulates the tyrosine phosphorylation of the  $\alpha$ -type 85-kDa subunit of phosphatidylinositol 3-kinase in vivo*, *J. Biol. Chem.*, (1992), **267**, 22575-22580.

**Hayashi, H., Y. Nishioka, S. Kamohara, F. Kanai, K. Ishii, Y. Fukui, F. Shibasaki, T. Takenawa, H. Kido, N. Katsunuma, Y. Ebina**, *The  $\alpha$ -type 85-kDa subunit of phosphatidylinositol 3-kinase is phosphorylated at tyrosines 368,580, and 607 by the insulin receptor*, *The Journal of Biological Chemistry*, (1993), **268**, 7107-7117.

**Heimbrook, D.C., A. Oliff**, *Therapeutic intervention and signaling*, *Curr. Opin. Cell. Biol.*, (1998), **10**, 284-288.

**Hill, C.S., R. Treisman**, *Transcriptional regulation by extracellular signal : Mechanism and specificity*, *Cell*, (1995), **80**, 199-211.

**Holt, K.H., B.G. Gasson, J.E. Pessin**, *Insulin stimulation of a MEK-dependent but ERK-independent SOS protein kinase*, *Mol. Cell. Biol.*, (1996), **16**, 577-583.

**Hotamisligil, G.S., P. Peraldi, A. Budavari, R. Ellis, M.F. White, B.M. Spiegelman,** *IRS-1-mediated inhibition of insulin receptor tyrosine kinase activity in TNF- $\alpha$  and obesity-induced insulin resistance*, *Science*, (1996), **271**, 665-667.

**Hu, Q., A. Klippel, A.J. Muslin, W.J. Fantl, L.T. Williams,** *Ras-dependent induction of cellular responses by constitutively active phosphatidylinositol-3 kinase*, *Science*, (1995), **268**, 100-102.

**Hunter, T.,** *Protein kinases and phosphatases : The yin and yang of protein phosphorylation and signaling*, *Cell*, (1995), **80**, 225-236.

**Hunter, T.,** *When is a lipid kinase not a lipid kinase? When it is a protein kinase*, *Cell*, (1995), **83**, 1-4.

**Inoue, G., B. Cheatham, R. Emkey, C.R. Kahn,** *Dynamics of insulin signaling in 3T3-L1 adipocytes*, *J. Biol. Chem.*, (1998), **273**, 11548-11555.

**Inukai, K., M. Funaki, T. Ogihara, H. Katagiri, A. Kanda, M. Anai, Y. Fukushima, T. Hosaka, M. Suzuki, B.C. Shin, K. Kataka, Y. Yazaki, M. Kikuchi, Y. Oka, T. Asano,** *p85 $\alpha$  gene generates three isoforms of regulatory subunit for phosphatidylinositol 3-kinase (PI 3-kinase), p55 $\alpha$ , p55 $\alpha$ , p85 $\alpha$ , with different PI 3-kinase activity elevating responses to insulin*, *J. Biol. Chem.*, (1997), **272**, 7873-7882.

**Kahn, B.B.,** *Type 2 diabetes : When insulin secretion fails to compensate for insulin resistance*, *Cell*, (1998), **92**, 593-596.

**Khokhlatchev, A.V., B. Canagarajah, J. Wilsbacher, M. Robinson, M. Atkinson, E. Goldsmith, M.H. Cobb,** *Phosphorylation of the MAP kinase ERK2 promotes its homodimerisation and nuclear translocation*, Cell, (1998), **93**, 605-615.

**Klarlund, J.K., A.D. Cherniack, M.P. Czech,** *Divergent mechanism for homologous desensibilization of p21ras by insulin and growth factor*, J. Biol. Chem., (1995), **270**, 23421-23428.

**Kolter, T., I. Uphues, J. Eckel,** *Molecular analysis of insulin resistance in isolated ventricular cardiomyocytes of obese Zucker rats*, Am. J. Physiol., (1997), **273**, E59-E67.

**Kosaki, A., K. Yamada, J. Guga, A. Otaka, H. Kuzuya,** *14-3-3 protein associates with insulin receptor substrate 1 and decreases insulin-stimulated phosphatidylinositol 3'-kinase activity in 3T3L1 adipocytes*, J. Biol. Chem., (1998), **273**, 940-944.

**Kowalski, A., H. Gazzano, M. Fehlmann, E. Van Obberghen,** *Dephosphorylation of the hepatic insulin receptor: Absence of intrinsic phosphatase activity in purified receptors*, B.B.R.C., (1983), **117**, 885-893.

**Kroder, G., B. Bossenmaier, M. Kellerer, E. Capp, B. Stoyanov, A. Muhlhofer, L. Berti, H. Horikoshi, A. Ullrich, H. Haring,** *Tumor necrosis factor- $\alpha$  and hyperglycemia-induced insulin resistance*, J. Clin. Invest., (1996), **97**, 1471-1477.

**Kulkarni, R.N., J.C. Bruning, J.N. Winnay, C. Postic, M.A. Magnuson, C.R. Kahn,** *Tissue-specific knockout of the insulin receptor in pancreatic  $\beta$  cells creates an insulin secretory defect similar to that in type 2 diabetes*, Cell, (1999), **96**, 329-339.



**Kusari, A.B., J. Byon, D. Bandyopadhyay, K.A. Kenner, J. Kusari,** *Insulin-induced mitogen-activated protein (MAP) kinase phosphatase-1 (MKP-1) attenuates insulin-stimulated MAP kinase activity : A mechanism for the feedback inhibition of insulin signaling*, Mol. Endo., (1997), **11**, 1532-1543.

**Lam, K., C.L. Carpenter, N.B. Ruderman, J.C. Friel, K.L. Kelly,** *The phosphatidylinositol 3-kinase serine kinase phosphorylates IRS-1*, J. Biol. Chem., (1994), **269**, 20648-20652.

**Langlois, W.J., T. Sasaoka, A.R. Saltiel, J.M. Olefsky,** *Negative feedback regulation and desensibilization of insulin and epidermal growth factor-stimulated p21ras activation*, J. Biol. Chem., (1995), **270**, 25320-25323.

**Leevers, S.J., B. Vanhaesebroeck, M.D. Waterfield,** *Signaling through phosphoinositide 3-kinase : the lipids take centre stage*, Current opinion in cell biology, (1999), **11**, 219-225.

**Li, J., K. DeFea, R.A. Roth,** *Modulation of insulin receptor substrate-1 tyrosine phosphorylation by Akt/Phosphatidylinositol 3-kinase pathway*, J. Biol. Chem., (1999), **274**, 9351-9356.

**Li, S., J.M. Sedivy,** *Raf-1 protein kinase activates the NF- $\kappa$ B transcription factor by dissociating the cytoplasmic NF- $\kappa$ B-I $\kappa$ B complex*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA., (1993), **90**, 9247-9251.

**Liu, Q., T. Sasaki, I. Kozieradzki, A. Wakeham, A. Itie, D.J. Dumont, J.M. Penninger,** *SHIP is a negative regulator of growth factor receptor-mediated PKB/Akt activation and myeloid cell survival*, Genes & Dev., (1999), **13**, 786-791.

**Lopez-Illasaca, M.**, *Signaling from G-protein-coupled receptors to mitogen-activated protein (MAP)-kinase cascades*, *Biochem. Pharmacol.*, (1998), **56**, 269-77.

**Lopez-Illasaca, M., P. Crespo, P.G. Pellici, J.S. Gutkind, R. Wetzker**, *Linkage of G protein-coupled receptors to the MAPK signaling pathway through PI 3-kinase gamma*, *Science*, (1997), **275**, 394-397.

**Margolis, B.**, *The PTP domain : The name doesn't say it all*, *TEM*, (1999), **10**, 262-265.

**Marshall, C.J.**, *Specificity of receptor tyrosine kinase signaling : Transient versus sustained extracellular signal-regulated kinase activation*, *Cell*, (1995), **80**, 179-185.

**Matsuda, S., Y. Gotoh, E. Nishida**, *Phosphorylation of xenopus mitogen-activated protein (MAP) kinase kinase by MAP kinase kinase kinase and MAP kinase*, *J. Biol. Chem.*, (1993), **268**, 3277-3281.

**Meier, R., B.A. Hemmings**, *Regulation of proteine kinase B*, *J. Receptor Signal Trans. Research*, (1999), **19**, 121-128.

**Meyerovitch, J., P. Rothenberg, Y. Shechter, S. Bonner-Weir, C.R. Kahn**, *Vanadate normalizes kyperglycemia in two mouse models of Non-insulin-dependent diabetes mellitus*, *J. Clin. Invest.*, (1991), **87**, 1286-1294.

**Meyerovitch, J., Z. Farfel, J. Sack, Y. Shechter**, *Oral administration of vanadate normalizes blood glucose levels in streptozotocin-treated rats*, *J. Biol. Chem.*, (1987), **262**, 6658-6662.

**Millward, T.A., S. Zolnierowicz, B.A. Hemmings**, *Regulation of protein kinase cascades by protein phosphatase 2A*, *TiBS*, (1999), **24**, 186-191.

**Morris, A.J., C.C. Malbon**, *Physiological regulation of G protein-linked signaling*, *Physiol. Rev.*, (1999), **79**, 1373-1420.

**Morrison, D.K., R.E. Cutler**, *The complexity of Raf-1 regulation*, *Curr. Opin. Cell. Biol.*, (1997), **9**, 174-179.

**Mothe, I., E. Van Obberghen**, *Phosphorylation of insulin receptor substrate-1 on multiple serine residues, 612, 632, 662, and 731, modulates insulin action*, *J. Biol. Chem.*, (1996), **271**, 11222-11227.

**Mumby, M.C., G. Walter**, *Protein serine/threonine phosphatases : Structure, regulation, and function in cell growth*, *Physiological Rev.*, (1993), **73**, 673-700.

**Myers, M.G., R. Mendez, P. Shi, J.H. Pierce, R. Rhoads, M.F. White**, *The COOH-terminal tyrosine phosphorylation sites on IRS-1 bind SHP-2 and negatively regulate insulin signaling*, *The J. Biol. Chem.*, (1998), **273**, 26908-26914.

**Myung, C.S., H. Yasuda, W.W. Liu, T.K. Harden, J.C. Garrison**, *Role of isoprenoid lipids on the heterotrimeric G protein  $\gamma$  subunit in determining effector activation*, *J. Biol. Chem.*, (1999), **274**, 16595-16603.

**Nechay, B.R., L.B. Nanninga, P.S.E. Nechay, R.L. Post, J.J. Grantham, I.G. Macara, L.F. Kubena, T.D. Phillips, F.H. Nielsen**, *Rôle of vanadium in biology*, *Federation Proceedings*, (1986), **45**, 123-132.

**Neel, B.G., N.K. Tonks**, *Protein tyrosine phosphatases in signal transduction*, *Curr. Opin. Cell. Biol.*, (1997), **9**, 193-204.

**Nishida, E., Y. Gotoh,** *The MAPK kinase cascade is essential for diverse signal transduction pathways*, *TiBS*, (1993), **18**, 128-131.

**O'Brien, R.M., D.K. Granner,** *Regulation of gene expression by insulin*, *Physiol. Rev.*, (1996), **76**, 1109-1161.

**Ogata, M., M. Oh-hora, A. Kosugi, T. Hamaoka,** *Inactivation of Mitogen-activated protein kinase by a mammalian tyrosine-specific phosphatase, PTPBR7*, *Biochem. Biophys. Res. Com.*, (1999), **256**, 52-56.

**Ogawa, W., T. Matozaki, M. Kasuga,** *Role of binding proteins to IRS-1 in insulin signalling*, *Mol. Cell. Biochem.*, (1998), **182**, 13-22.

**Pandey, S.K., J.L. Chiasson, A.K. Srivastava,** *Vanadium salts stimulate mitogen-activated protein (MAP) kinases and ribosomal S6 kinases*, *Mol. Cell. Biochem.*, (1995), **153**, 69-78.

**Pandey, S.K., M.B. Anand-Srivastava, A.K. Srivastava,** *Vanadyl Sulfate-stimulated glycogen synthesis is associated with activation of Phosphatidylinositol 3-kinase and is independent of insulin receptor tyrosine phosphorylation*, *Biochemistry*, (1998), **37**, 7006-7014.

**Pandey, S.K., J.F. Theberge, M. Bernier, A.K. Srivastava,** *Phosphatidylinositol 3-kinase requirement in activation of the ras/C-raf-1/MEK/ERK and p70s6k signaling cascade by the insulinmimetic agent vanadyl sulfate*, *Biochemistry*, (1999), **38**, 14667-14675.

**Paz, K., Y.F. Liu, H. Shorer, R. Hemi, D. LeRoith, M. Quan, H. Kanety, R. Seger, Y. Zick,** *Phosphorylation of insulin receptor substrate-1 (IRS-1) by protein kinase B positively regulates IRS-1 Function*, *J. Biol. Chem.*, (1999), **274**, 28816-28822.

**Peraldi, P., J.C. Scimeca, C. Filloux, E. Van Obberghen,** *Regulation of extracellular signal-regulated protein kinase-1 (ERK-1;pp44/mitogen-activated protein kinase) by epidermal growth factor and nerve growth factor in PC12 cells : Implication of ERK1 inhibitory activities,* *Endo.*, (1993), **132**, 2578-2585.

**Poucheret, P., S. Verma, M.D. Grynopas, J.H. McNeill,** *Vanadium and diabetes,* *Mol. Cell. Biochem.*, (1998), **188**, 73-80.

**Qiao, L.Y., J.L. Goldberg, J.C. Russell, X.J. Sun,** *Identification of enhanced serine kinase activity in insulin resistance,* *J. Biol. Chem.*, (1999), **274**, 10625-10632.

**Rabasa-Lhoret, R., J.L. Chiasson,** *Insulin therapy : Decreasing diabetes complications,* *The Canadian Journal of CME*, (1997), **9**, 75-88.

**Ramanadham, S., J.J. Mongold, R.W. Brownsey, G.H. Cros, J.H. McNeill,** *Oral vanadyl sulfate in treatment of diabetes mellitus in rats,* *Am. J. Physiol.*, (1989), **257**, H904-H911.

**Rameh, L.E., C.S. Chen, L.C. Cantley,** *Phosphatidylinositol (3,4,5)P<sub>3</sub> interacts with SH2 domains and modulates PI 3-kinase association with tyrosine-phosphorylated proteins,* *Cell*, (1995), **83**, 821-830.

**Reaven, G.M.,** *Pathophysiology of insulin resistance in human disease,* *Physiol. Rev.*, (1995), **75**, 473-486.

**Reusch, J.E.B., P. Hsieh, D. Klemm, J. Hoeffler, B. Draznin,** *Insulin inhibits dephosphorylation of adenosine 3',5'-monophosphate response element-binding protein/activating transcription factor-1 : Effect on nuclear phosphoserine phosphatase-2a,* *Endo.*, (1994), **135**, 2418-2422.

**Reusch, J.E.B., P. Hsieh, P. Bhuripanyo, K. Carel, J.W. Leitner, J.M. Olefsky, B. Draznin,** *Insulin inhibits nuclear phosphatase activity : Requirement for the C-terminal domain of the insulin receptor*, *Endo.*, (1995), **136**, 2464-2469.

**Robinson, M.J., M.H. Cobb,** *Mitogen-activated protein kinase pathways*, *Curr. Opin. Cell. Biol.*, (1997), **9**, 180-186.

**Rodriguez-Viciana, P., P.H. Warne, R. Dhand, B. Vanhaesebroeck, I. Gout, M.J. Fry, M.D. Waterfield, J. Downward,** *Phosphatidylinositol-3-OH kinase as a direct target of Ras*, *Nature*, (1994), **370**, 527-532., *Nature*, 370, 1994, 527-532.

**Rubio, I., P. Rodriguez-Viciana, J. Downward, R. Wetzker,** *Interaction of Ras with phosphoinositide 3-kinase gamma*, *Biochem. J.*, (1997), **326**, 891-895.

**Rubio, I., U. Wittig, C. Meyer, R. Heinze, D. Kadereit, H. Waldmann, J. Downward, R. Wetzker,** *Farnesylation of Ras is important for the interaction with phosphoinositide 3-kinase gamma*, *Eur. J. Biochem.*, (1999), **266**, 70-82.

**Ruderman, N.B., R. Kapeller, M.F. White, L.C. Cantley,** *Activation of phosphatidylinositol 3-kinase by insulin*, *P.N.A.S.*, (1990), **87**, 1411-1415.

**Sajan, M., M.L. Standaert, G. Bandyopadhyay, M.J. Quon, T.R. Burke Jr., R.V. Farese,** *Protein kinase C- $\xi$  and phosphoinositide-dependent protein kinase-1 are required for insulin-induced activation of ERK in rat adipocytes*, *J.B.C.*, (1999), **274**, 30495-30500.

**Satoh, T., W.J. Fantl, J.A. Excobedo, L.T. Williams, Y. Kaziro,** *Platelet-derived growth factor receptor mediates activation of ras through different signaling pathways in different cell types*, *Mol. Cell. Biol.*, (1993), **13**, 3706-3713.

**Scheid, M.P., K.M. Schubert, V. Duronio,** *Regulation of BAD phosphorylation and association with Bcl-Xl by the MAPK/ERK kinase*, J. Biol. Chem., (1999), **274**, 31108-31113.

**Schramek, H., M. Schumacher, W. Pfaller,** *Sustained EKK-2 activation in rat glomerular mesangial cells : differential regulation by protein phosphatases*, Am. J. Physiol., (1996), **271**, F423-F432.

**Seabra, M.C.,** *Membrane association and targeting of prenylated Ras-like GTPases*, Cell Signal, (1998), **3**, 167-172.

**Seger, R., E.G. Krebs,** *The MAPK signaling cascade*, FASEB J., (1995), **9**, 726-735.

**Sekar, N., J. Li, Y. Shechter,** *Vanadium salts as insulin substitutes :Mechanisms of action, a scientific and therapeutic tool in diabetes mellitus research*, Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol., (1996), **31**, 339-359.

**Sekar, N., J. Li., Z. He, D. Gefel, Y. Shechter,** *Independent signal-transduction pathways for vanadate and for insulin in the activation of glycogen synthase and glycogenesis in rat adipocytes*, Endo., (1999), **140**, 339-359.

**Shepherd, P.R., D.J. Withers, K. Siddle,** *Phosphoinositide 3-kinase : the key switch mechanism in insulin signaling*, Biochem. J., (1998), **333**, 471-490.

**Sjolander, A., K. Yamamo, B.E. Huber, E.G. Lapetina,** *Association of p21ras with phosphatidylinositol 3-kinase*, PNAS, (1991), **88**, 7908-7912.

**Slupsky, J.R., U. Quitterer, C.K. Weber, P. Gierschik, M.J. Lohse, U.R. Rapp,** *Binding of G $\beta\gamma$  subunits to Raf-1 downregulates G-protein-coupled receptor signalling*, Curr. Biol., (1999), **9**, 971-974.

**Srivastava, A.K.**, *Use of pharmacological agents in elucidating the mechanism of insulin action*, *TiPS*, (1998), **19**, 205-209.

**Standaert, M.L., G. Bandyopadhyay, R.V. Farese**, *Studies with wortmannin suggest a role for phosphatidylinositol 3-kinase in the activation of glycogen synthase and mitogen-activated protein kinase by insulin in rat adipocytes: comparison of insulin and protein kinase C modulators*, *B.B.R.C.*, (1995), **209**, 1082-1088.

**Stone, R.L., J.E. Dixon**, *Protein-tyrosine phosphatases*, *J. Biol. Chem.*, (1994), **269**, 31323-31326.

**Sun, H., C.H. Charles, L.F. Lau, N.K. Tonks**, *MKP-1 (3CH134), an immediate early gene product, is a dual specificity phosphatase that dephosphorylates MAP kinase in vivo*, *Cell*, (1993), **75**, 487-493.

**Tanasijevic, M.J., M.G. Myers, R.S. Thoma, D.L. Crimmins, M.F. White, D.B. Sacks**, *Phosphorylation of the insulin receptor substrate IRS-1 by casein kinase II*, *J. Biol. Chem.*, (1993), **268**, 18157-18166.

**Tanti, J.F., T. Grémeaux, E.V. Obberghen, Y. Le Marchand-Brustel**, *Insulin receptor substrate 1 is phosphorylated by serine kinase activity of phosphatidylinositol 3-kinase*, *Biochem. J.*, (1994a), **304**, 17-21.

**Tanti, J.F., T. Grémeaux, E.V. Obberghen, Y. Le Marchand-Brustel**, *Serine/threonine phosphorylation of insulin receptor substrate 1 modulates insulin receptor signaling*, *J. Biol. Chem.*, (1994b), **269**, 6051-6057.

**Thomas, G., M.N. Hall**, *TOR signalling and control of cell growth*, *Curr. Opin. Cell. Biol.*, (1997), **9**, 782-787.



**Todd, J.L., K.G. Tanner, J.M. Denu,** *Extracellular regulated kinases (ERK1) and ERK2 are authentic substrates for the dual-specificity protein-tyrosine phosphatase VHR*, J. Biol. Chem., (1999), **274**, 13271-13280.

**Toker, A., L.C. Cantley,** *Signaling through the lipid products of phosphoinositide-3-OH kinase*, Nature, (1997), **387**, 673-676.

**Tzivion, G., Z. Luo, J. Avruch,** *A dimeric 14-3-3 protein is an essential cofactor for Raf kinase activity*, Nature, (1998), **394**, 88-92.

**Ueda, Y., S.I. Hirai, S.I. Osada, A. Suzuki, K. Mizuno, S. Ohno,** *Protein kinase C  $\delta$  activates the MEK-ERK pathway in a manner independent of ras and dependent on raf*, J.B.C., (1996), **271**, 23512-23519.

**Uehara, T., Y. Tokumitsu, Y. Nomura,** *Wortmannin inhibits insulin-induced Ras and mitogen-activated protein kinase activation related to adipocyte differentiation in 3T3-L1 fibroblasts*, B.B.R.C., (1995), **210**, 574-580.

**Vanhaesebroeck, B., K. Higashi, C. Raven, M. Welham, S. Anderson, P. Brennan, M.D. Waterfield,** *Autophosphorylation of p110 $\delta$  phosphoinositide 3-kinase : anew paradigm for the regulation of lipid kinases in vitro and in vivo*, The EMBO Journal, (1999), **18**, 1292-1302.

**Virkamäki, A, K. Ueki, C.R. Kahn,** *Protein-protein interaction in insulin signaling and the molecular mechanism of insulin resistance*, J. Clin. Invest., (1999), **103**, 931-943.

**Vlahos, C.J., W.F. Matter, K.Y. Hui, R.F., Brown,** *A specific inhibitor of phosphoinositide 3-kinase 2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one (LY294002)*, J. Biol. Chem., (1994), **269**, 5241-5248.

**Vollenweider, P.**, *An SH2 domain-containing 5' inositolphosphatase inhibits insulin-induced GLUT4 translocation and growth factor-induced actin filament rearrangement*, Mol. Cell. Biol., (1999), **19**, 1081-91.

**Vollenweider, P., M. Clodi, S.S. Martin, T. Imamura, W.M. Kavanaugh, J.M. Olefsky, K.S. Walker, M. Deak, A. Paterson, K. Hudson, P. Cohen, D.R. Alessi**, *Activation of protein kinase B  $\beta$  and  $\gamma$  isoforms by insulin in vivo and by 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 in vitro : comparison with protein kinase B  $\alpha$* , Biochem. J., (1998), **331**, 299-308.

**Walker, K.S., M. Deak, A. Paterson, K. Hudson, P. Cohen, D.R. Alessi**, *Activation of protein kinase B  $\beta$  and  $\gamma$  isoforms by insulin in vivo and by 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 in vitro: comparison with protein kinase B  $\alpha$* , Biochem. J., (1998), **331**, 299-308.

**Wang, H.G., U.R. Rapp, J.C. Reed**, *Bcl-2 target the protein kinase Raf-1 to mitochondria*, Cell, (1996), **87**, 629-638.

**Waters, S.B., K. Yamauchi, J.E. Pessin**, *Insulin-stimulated dissociation of the SOS-Grb2 complex*, Mol. Cell. Biol., (1995), **15**, 2791-2799.

**Welsh, G.I., E.J. Foulstone, S.W. Young, J.M. Tavaré, C.G. Proud, M.F. White**, *The IRS-signaling system : A network of docking proteins that mediate insulin action*, Mol. Cell. Biochem., (1998), **182**, 3-11.

**Widmann, C., S. Gibson, M.B. Jarpe, G.L. Johnson**, *Mitogen-Activated protein kinase : Conservation of a three-kinase module from yeast to human*, Physiol. Rev., (1999), **79**, 143-180.

**Withers, D.J., J.S. Gutierrez, H. Towery, D.J. Burks, J.M. Ren, S. Previs, Y. Zhang, D. Bernal, S. Pons, G.I. Shulman, S. Bonner-Weir, M.F. White,** *Disruption of IRS-2 causes type 2 diabetes in mice*, Nature, (1998), **391**, 900-904.

**Wu, J., L.F. Lau, T.W. Sturgill,** *Rapid desactivation of MAP kinase in PC12 cells occurs independently of induction of phosphatase MKP-1*, FEBS Letters, (1994), **353**, 9-12.

**Wunderlich, L., A. Farago, L. Buday,** *Characterization of interaction of Nck with Sos and dynamin*, Cell Signal, (1998), **11**, 25-29.

**Wymann, M.P., G. Bulgarelli-Leva, M.J., Zvelebil, L. Pirola, B. Vanhaesebroeck, M.D., Waterfield, G. Panayotou,** *Wortmannin inactivates phosphatidylinoside 3-kinase by covalent modification of Lys-802, a residue involved in the phosphate transfer reaction*, Mol. Cell. Biol., (1996), **16**, 1722-1733.

**Wymann, M.P., L. Pirola,** *Structure and function of phosphoinoside 3-kinases*, BBA, (1998), **1436**, 127-150.

**Yamauchi, K., K. Holt, J.E. Pessin,** *Phosphatidylinositol 3-kinase functions upstream of Ras and Raf in mediating insulin stimulation of c-fos transcription*, J. Biol. Chem., (1993), **269**, 14597-14600.

**Zhao, H., S. Okada, J.E. Pessin, G.A. Koretzky,** *Insulin receptor-mediated dissociation of Grb2 from Sos involves phosphorylation of Sos by kinase(s) other than extracellular signal-regulated kinase*, J. Biol. Chem., (1998), **273**, 12061-12067.