

Université de Montréal

Rôle de la protéine phosphatase PPM1A dans l'homéostasie hépatique
du glucose et des lipides

Par

Lai-Frédéric Ouellet

Département de Biochimie

Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
En vue de l'obtention du grade de Maître ès Sciences en Biochimie

Décembre 2009

© Lai-Frédéric Ouellet 2009

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Université de Montréal
Faculté de Médecine

Ce mémoire intitulé :

Rôle de la protéine phosphatase PPM1A dans l'homéostasie hépatique
du glucose et des lipides

Présenté par

Lai-Frédéric Ouellet

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes

Dr Alain Moreau
Président-rapporteur

Dr Mounib Elchebly
Directeur de recherche

Dr Édouard Kouassi
Membre du Jury

RÉSUMÉ

L'insuline est une hormone essentielle qui induit des réponses complexes dans l'organisme pour maintenir l'homéostasie du glucose et des lipides. La résistance à son action est un phénomène pathologique observé dans un large éventail de situations, allant de l'obésité et du syndrome métabolique à la stéatose hépatique et au diabète de type 2, qui aboutissent au développement de l'athérosclérose et de la mortalité. Des avancées remarquables ont été réalisées dans notre compréhension des mécanismes moléculaires responsables du développement de la résistance à l'action de l'insuline. En particulier, l'induction d'un stress cellulaire par des taux élevés d'acides gras libres (AGL) et des cytokines, via l'activation des protéines Ser/Thr kinases, qui augmente la phosphorylation sur des résidus sérine, des molécules critiques impliquées dans la signalisation insulinaire (p. ex. IR, IRS et p85) et conduit à la diminution de la réponse cellulaire à l'insuline. Cependant, la plupart des chercheurs ont limité leur travail dans l'investigation du rôle des protéines kinases susceptibles de modifier la réponse cellulaire à l'insuline. Donc, peu de données sont disponibles sur le rôle des Protéines Ser/Thr phosphatases (PS/TPs), même si il est bien établi que la phosphorylation de ces protéines est étroitement régulée par un équilibre entre les activités antagonistes des Ser/Thr kinases et des PS/TPs.

Parmi les PS/TPs, PPM1A (également connu sous le nom PP2C α) est une phosphatase particulièrement intéressante puisqu'il a été suggéré qu'elle pourrait jouer un rôle dans la régulation du métabolisme lipidique et du stress cellulaire. Ainsi, en se basant sur des résultats préliminaires de notre laboratoire et des données de la littérature, nous avons émis l'hypothèse selon laquelle PPM1A pourrait améliorer la sensibilité à l'insuline en diminuant l'activité des protéines kinases qui seraient activées par le stress cellulaire induit par l'augmentation des AGL. Ces effets pourraient finalement améliorer le métabolisme glucidique et lipidique dans l'hépatocyte. Ainsi, pour révéler le rôle physiologique de PPM1A à l'échelle d'un animal entier, nous avons généré un modèle animal qui la surexprime spécifiquement dans le foie.

Nous décrivons ici notre travail afin de générer ce modèle animal ainsi que les premières analyses pour caractériser le phénotype de celui-ci. Tout d'abord, nous avons remarqué que la surexpression de PPM1A chez les souris C57BL/6J n'a pas d'effets sur le gain de poids sur une longue période. Deuxièmement, nous avons observé que PPM1A a peu d'effets sur l'homéostasie du glucose. Par contre, nous avons montré que sa surexpression a des effets significatifs sur l'homéostasie du glycogène et des triglycérides. En effet, nous avons observé que le foie des souris transgéniques contient moins de glycogène et de triglycérides que le foie de celles de type sauvage. De plus, nos résultats suggèrent que les effets de la surexpression de PPM1A pourraient refléter son impact sur la synthèse et la sécrétion des lipides hépatiques puisque nous avons observé que sa surexpression conduit à l'augmentation la triglycéridémie chez les souris transgéniques.

En conclusion, nos résultats prouvent l'importance de PPM1A comme modulateur de l'homéostasie hépatique du glucose et des lipides. Des analyses supplémentaires restent cependant nécessaires pour confirmer ceux-ci et éclaircir l'impact moléculaire de PPM1A et surtout pour identifier ses substrats.

Mots Clés : Protéine phosphatase dépendante du magnésium 1A (PPM1A), insuline, diabète, foie, glucose, glycogène, triglycérides

ABSTRACT

Insulin is a key hormone that elicits complex responses in the body to maintain glucose and lipid homeostasis. Impaired sensitivity to insulin is present throughout a spectrum of inter-related disorders ranging from obesity and metabolic syndrome to hepatic steatosis and type 2 diabetes, which promotes atherogenesis and mortality. Remarkable strides have been achieved in the molecular mechanisms responsible for the development of insulin resistance that has been associated with a chronic inflammatory state and an activation of cellular stress responses. In particular, the activation of cellular stress by elevated levels of free fatty acids (FFA) and cytokines, via upstream protein Ser/Thr kinases, increase the serine phosphorylation of critical molecules involved in insulin signaling pathway (e.g. IR, IRS and p85) and leads to decreased insulin response. However, most of the investigators have limited their works to stress-activated kinases capable of altering the cellular insulin responsiveness. Conversely, limited data are available on upstream Protein Ser/Thr phosphatases (PS/TPs), even if it is well established that the activity of stress-activated kinases is tightly regulated by a delicate balance between the opposing activities of both Ser/Thr kinases and PS/TPs.

Among the PS/TPs associated with insulin resistance conditions, PPM1A (also known as PP2C α) is of particular interest in the regulation of lipid metabolism and cellular stress. Based on our recent findings and preliminary data, we postulate that PPM1A plays a significant role in insulin resistance via dephosphorylation and lessening of FFA-activated stress kinases, mainly in the liver, an important organ in glucose and lipid metabolism. More specifically, we hypothesize that increasing PPM1A activity might improve the insulin responsiveness by down regulating the activity of stress-activated kinases and by improving lipid metabolism in the hepatocyte. Thus, to reveal the physiological role of PPM1A in whole animal, we generated an animal model that overexpresses PPM1A specifically in the liver.

In the present research report, we describe our work to generate this animal model as well as the initial analyses to characterize the phenotype of these mice. Accordingly, we first noticed that overexpression of PPM1A in C57BL/6J mice has no effects on weight gain over a long period. Secondly, we observed that PPM1A has subtle effects on glucose homeostasis. However and more importantly, we showed that overexpression of PPM1A has a significant effect on both glycogen and triglycerides homeostasis. Indeed, we observed that the liver of PPM1A transgenic mice had less glycogen and triglycerides than their littermates' wild type mice. Our results suggest that these effects might reflect the impact of PPM1A on lipids synthesis and secretion since we observed that overexpression of PPM1A leads to increase the triglyceridemia in the transgenic mice.

En conclusion, our results pinpoint PPM1A as an important modulator of hepatic glucose and lipid metabolism. However, further analyses are needed to confirm these results, to decipher the molecular impact of PPM1A and particularity to identify its substrates.

Keywords: Magnesium dependant protein phosphatase 1A (PPM1A), insulin, diabetes, liver, glucose, glycogen, triglycerides

Table des matières

Résumé	iii
Abstract	iv
Table des matières	v
Liste des figures	ix
Liste des tableaux	x
Liste des sigles et abréviations	xi
Remerciements	xiv
1. INTRODUCTION	1
1.1. Le Syndrome métabolique	2
1.1.1. Généralités	2
1.1.2. Définition	2
1.1.3. Les principales causes du syndrome métabolique	2
1.1.3.1. Les causes génétiques	2
1.1.3.2. L'obésité	3
1.1.4. Les complications du syndrome métabolique	4
1.2. Le Diabète	4
1.2.1. Généralités	4
1.2.2. Définition	5
1.2.3. Les trois types de diabète	5
1.2.4. Les causes du diabète de type 2	6
1.3. La résistance à l'insuline	6
1.3.1. Généralités	6
1.3.2. Définition	7
1.3.3. La signalisation intracellulaire induite par l'insuline	7
1.3.3.1. Biosynthèse de l'insuline	7
1.3.3.2. Activation du récepteur d'insuline	8
1.3.3.3. Substrat du récepteur d'insuline	9
1.3.3.4. Transduction du signal insulinique – de la PI3K à Akt	9
1.3.3.5. Effet de l'insuline sur le foie, les tissus adipeux et les muscles	11
1.3.4. Les mécanismes de la résistance à l'insuline	12

1.3.4.1. L'importance des PTPs dans la résistance à l'insuline	12
1.3.4.2. Le rôle des sérine/thréonine kinases dans la résistance à l'insuline	12
1.3.5. Rôle de l'obésité dans la pathogénèse de la résistance à l'insuline	13
1.3.5.1. Les acides gras libres	14
1.3.5.2. Les agents inflammatoires	15
1.3.5.3. Le stress du réticulum endoplasmique	15
1.3.5.4. Autres hormones adipeuses	16
1.4. Les protéines phosphatases	17
1.4.1. Les cinq grandes familles de protéines phosphatases	18
1.4.1.1. Les Protéines Tyrosine Phosphatases	18
1.4.1.2. Les phosphatases à lipides	18
1.4.1.3. Les histidine phosphatases	18
1.4.1.4. Les phosphatases à double spécificité	19
1.4.1.5. Les Sérine/Thréonine phosphatases	19
1.4.1.5.1. Les protéines phosphatases 1 (PP1)	19
1.4.1.5.2. Les protéines phosphatases 2A (PP2A)	19
1.4.1.5.3. La protéine phosphatase 2B (PP2B)	20
1.4.1.5.4. La protéine phosphatase 2C (PP2C)	20
1.5. La Protéine Phosphatase Magnésium-dépendant 1A (PPM1A)	20
1.5.1. Clonage et identification de PPM1A	21
1.5.2. Structure et localisation du gène encodant PPM1A	21
1.5.3. Contrôle de l'expression de PPM1A	21
1.5.4. La structure de PPM1A	22
1.5.5. Le mécanisme catalytique de PPM1A	23
1.5.6. Contrôle de l'activité de PPM1A	24
1.5.7. Le rôle de PPM1A	25
1.5.7.1. Régulation du stress énergétique	25
1.5.7.2. Le contrôle du cycle cellulaire et de l'apoptose	26
1.5.7.3. Modulation des kinases de stress	28
1.5.7.4. Effet sur la signalisation du récepteur d'insuline	29
1.5.7.5. Autres substrats de PPM1A	30
1.6. Hypothèse et Objectifs	31

2. MATÉRIEL ET MÉTHODES	32
2.1. Anticorps et Réactifs	33
2.1.1. Anticorps	33
2.1.2. Réactifs utilisés sur les souris	33
2.2. Plasmides de surexpression de gène humain PPM1A	33
2.2.1. Plasmides de surexpression de gène hPPM1A dans les cellules HepG2	33
2.2.2. Construction du vecteur de transgénèse	34
2.3. Validation du vecteur de transgénèse	34
2.3.1. Séquençage des plasmides d'expression et du vecteur transgénique	34
2.3.2. Expression de vecteur de transgène dans les hépatocytes HepG2	35
2.4. Génotypage des souris hPPM1A-Myc/His	35
2.4.1. Extraction de l'ADN génomique des queues de souris	35
2.4.2. Amplification du transgène	36
2.4.3. Migration sur gel d'agarose	36
2.5. Analyses de phénotype des souris transgéniques	36
2.5.1. Prélèvement de sang et des foies	36
2.5.2. Dosage des protéines et préparation des extraits de foie	36
2.6. Immunobuvardage de Type Western	37
2.6.1. Séparation des protéines sur un gel de polyacrylamide	37
2.6.2. Transfert des protéines sur une membrane de PVDF	37
2.6.3. Immunobuvardage de Type Western des protéines	37
2.6.4. Révélation des membranes	37
2.6.5. Décapage des anticorps	38
2.7. Suivi de la croissance pondérale des souris	38
2.8. Extraction et dosage du glycogène hépatique	38
2.9. Extraction et dosage des triglycérides hépatiques	39
2.10. Mesure de la glycémie plasmatique	39
2.11. Test de tolérance au glucose	40
2.12. Test de tolérance à l'insuline	40
2.13. Analyses Statistiques	40
3. RÉSULTATS	41
3.1. Génération de vecteur de transgène	42

3.2. Validation du vecteur de transgénèse	43
3.3. Identification des souris transgéniques	46
3.4. Expression spécifique au foie du transgène	49
3.5. Croissance pondérale des souris transgéniques	49
3.6. La glycémie des souris transgéniques	51
3.7. La tolérance au glucose et à l'insuline des souris transgéniques	52
3.8. Le glycogène hépatique des souris transgéniques	54
3.9 Les triglycérides hépatiques et la triglycéridémie des souris transgéniques	55
4. DISCUSSION	57
4.1. Génération des souris transgéniques	58
4.2. Identification des souris transgéniques	59
4.3. Caractérisation de phénotype des souris transgéniques	60
5. CONCLUSION ET PERSPECTIVES	63
6. RÉFÉRENCES	65

Liste des figures

Figure 1.1 Résumé des facteurs sécrétés par ou dans les tissus adipeux	4
Figure 1.2 Résumé de la biosynthèse de l'insuline	8
Figure 1.3 Sites d'interactions et de phosphorylation des protéines IRS	10
Figure 1.4 Transduction du signal par la voie de signalisation du récepteur insuline	11
Figure 1.5 Résidus sérine/thréonine phosphorylés sur IRS1 en réponse à différents facteurs.	14
Figure 1.6 Voie de signalisation induite par le stress du réticulum endoplasmique	17
Figure 1.7 Structure génomique de PPM1A	21
Figure 1.8 Structure tridimensionnelle de PPM1A obtenue par cristallographie avec diffraction aux rayons X	22
Figure 1.9 Représentation de PPM1A sous forme de surface dans l'espace	23
Figure 1.10 Mécanisme possible de la déphosphorylation d'une sérine/thréonine par PPM1A	24
Figure 1.11 Modulation de l'activité de l'AMPK par PPM1A	26
Figure 1.12 Modulation du cycle cellulaire par PPM1A	27
Figure 1.13 Modulation des kinases associées au stress par PPM1A	29
Figure 3.1 Vecteur d'expression de PPM1A	43
Figure 3.2 Validation du vecteur de transgénèse	45
Figure 3.3 Activité phosphatasique de PPM1A	46
Figure 3.4 Identification des souris transgéniques	48
Figure 3.5 Expression spécifique au foie du transgène	50
Figure 3.6 Croissance pondérale des souris transgéniques	51
Figure 3.7 Tolérance au glucose et à l'insuline	53
Figure 3.8 Dosage du glycogène hépatique	54
Figure 3.9 Dosage des triglycérides	56

Liste des Tableaux

Tableau I	Liste des critères diagnostiques du syndrome métabolique selon l'Organisation Mondiale de la Santé et le National Institute of Health	3
Tableau II	Glycémie des souris de type sauvage vs glycémie des souris transgéniques à jeun et en présence d'une diète normale	52

Liste des Abréviations

α	Anti
ADN	Acide déoxyribonucléique
ADNc	Acide déoxyribonucléique codant
AMP	Adénosine monophosphate
AMPK	Protéine kinase activée par l'AMP (AMP-activated Protein Kinase)
ARNm	Acide ribonucléique messager
ASK1	Kinase régulant le signal de l'apoptose 1 (Apoptosis Signal-regulating Kinase 1)
ASP	Acide Aspartique
ATF6	Facteur de transcription activant 6 (Activating Transcription Factor 6)
ATP	Adénosine triphosphate
BAD	Agoniste de la mort cellulaire associé à Bcl2 (Bcl2-associated Agonist of cell Death)
CaM Kinase II	Protéine kinase dépendante du Ca^{2+} et de la calmoduline (Ca ²⁺ /calmodulin dependant protein Kinase II)
Cdk2	Kinase dépendante des cyclines 2 (Cyclin-Dependant Kinase 2)
DARPP32	Phosphoprotéine de 32 kDa régulée par la dopamine et l'AMP cyclique (Dopamine and cAMP Regulated Phosphoprotein of 32 kDa)
eIF2	Facteur d'initiation eucaryote 2 (Eucaryotic Initiation Factor 2)
GSK3 β	Kinase 3 β de la glycogène synthase (Glycogen Synthase Kinase 3 β)
HDL	Lipoprotéine de haute densité (High Density Lipoprotein)
Hg	Mercure
HMG Coa	Hydroxylmethylglutaryl-coenzyme A
HRP	Peroxydase du raifort (HorseRadish Peroxydase)
HSL	Lipase sensible aux hormones (Hormon Sensitive Lipase)
IKK	Kinase d'I κ B (I κ B Kinase)
IL6	Interleukine 6
INS2	Insuline II

IRS1	Substrat du récepteur insuline 1 (Insulin Receptor Substrate 1)
IRS2	Substrat du récepteur insuline 2 (Insulin Receptor Substrate 2)
JNK	Kinase de l'extrémité N-terminale de c-Jun (c-Jun N-terminal Kinase)
MAPK	Protéine kinase activée par les agents mitogènes (Mitogen Activated Protein Kinase)
Mg ²⁺	ion magnésium
mGluR3	Récepteur Metabotropic du glutamate 3 (Metabotropic Glutamate Receptor 3)
MKK	Kinase de la Map Kinase
MLK3	Kinase de lignée mixte 3 (Mixed Lineage Kinase 3)
mTOR	Cible de la rapamycine chez les mammifères (mamalian Target Of Rapamycin)
NMDA	D-Acide Aspartique N-Méthyle (N-Methyl-D-Aspartic Acid)
NO	Oxyde Nitrique (Nitric Oxyde)
PAGE	Électrophorèse sur gel de polyacrylamide (PolyAcrylamide Gel Electrophoresis)
PCR	Réaction en chaîne de polymérase (Polymerase Chain Reaction)
PDK1	Isozyme 1 de la kinase de la pyruvate dehydrogenase (Pyruvate Dehydrogenase Kinase Isozyme 1)
PDK2	Isozyme 2 de la kinase de la pyruvate dehydrogenase (Pyruvate Dehydrogenase Kinase Isozyme 2)
PERK	Kinase du réticulum endoplasmique semblable à une protéine kinase (Protein kinase-like Endoplasmic Reticulum Kinase)
PH	Domaine homologue à la pleckstrine (Pleckstrin Homology)
PI3K	Phosphoinositide 3 kinase
PIP ₂	Phosphatidyl inositol 2 phosphate
PIP ₃	Phosphatidyl inositol 3 phosphate
PKC	Protéine kinase C
PP1	Protéine phosphatase 1
PP2A	Protéine phosphatase 2 isoforme A
PP2B	Protéine phosphatase 2 isoforme B
PP2C	Protéine phosphatase 2 isoforme C

PPM1A	Protéine phosphatase dépendante du magnésium 1 isoforme A
PTB	Domaine de liaison des phosphotyrosines (Phospho Tyrosine Binding)
PTEN	Phosphatase et homologue de la tensine (Phosphatase and Tensin homolog)
PTP	Protéine tyrosine phosphatase
PTP-1B	Protéine tyrosine phosphatase 1B
RE	Réticulum endoplasmique
rPTP α	Protéine tyrosine phosphatase α chez le rat
S1P	Sphingosine-1-phosphate
SAPK	Protéine kinase activée par le stress (Stress Activated Protein Kinase)
SEM	Erreur standard sur la moyenne (Standard Error of the Mean)
SH2	Domaine homologue à src 2 (Src Homology 2)
SHIP	Innositol-5-phosphatase contenant un domaine SH2 (SH2 containing Innositol-5-Phosphatase)
TGF	Facteur de croissance des tumeurs (Tumor Growth Factor)
TNF α	Facteur de nécrose de tumeur α (Tumor Necrosis Factor α)
TRAF2	Facteur 2 associé au récepteur TNF (TNF Receptor Associated Factor 2)

Remerciements

Je désire remercier en premier lieu mes parents, Mario Ouellet et Khamsouane Souayekoumane qui m'ont toujours poussé à faire de mon mieux ainsi que ma sœur Mélinda et ma fiancée Maria Lisa qui ont toujours été derrière moi dans tout ce que j'ai décidé de faire.

Merci à mon directeur de recherche, Dr. Mounib Elchebly de m'avoir accueilli dans son laboratoire et aidé dans cet accomplissement et à Ali Ben Djoudi Ouadda, mon collègue pour m'avoir aidé durant toutes ces années.

Un merci spécial à Thérèse Rouleau du laboratoire du Dr. Jean-Claude Lavoie et aux gens du laboratoire du Dr. Émile Levy (spécialement Carole Garrofalo) pour leur aide avec différentes méthodes et le matériel qu'elles requièrent.

Merci.

1. INTRODUCTION

1.1. Le syndrome métabolique

1.1.1. Généralités

Dans le monde, plus de 247 millions d'individus seraient affectés par le syndrome métabolique et on projette que ce nombre s'élèvera à plus de 380 millions de personnes en 2025 [1]. Aux États-Unis, environ 47 millions d'Américains sont en ce moment atteints du syndrome et on estime que la prévalence est d'environ 23,7% de la population américaine [2]. Ce syndrome affecte également beaucoup de Canadiens, puisque la prévalence de ce syndrome au Canada se situe entre 15 et 20 % [3]. De plus, les répercussions économiques du syndrome métabolique sont très importantes. En effet, en 2010, le fardeau du syndrome métabolique sur le système de santé canadien correspondra à 15,6 milliards de dollars et devrait passer en 2020 à près de 20 milliards de dollars.

1.1.2. Définition

Le syndrome métabolique est un regroupement de conditions pathologiques qui augmente le risque d'être atteint de maladies cardiaques et/ou du diabète de type 2. Aussi connu sous les noms de syndrome de résistance à l'insuline et de syndrome métabolique X, sa définition fut l'objet de multiples débats parmi les médecins et les chercheurs. Il existe actuellement deux systèmes de classifications (voir tableau I) largement utilisés qui partagent des facteurs de risques cardiovasculaires similaires incluant l'obésité abdominale, la résistance à l'insuline, la dyslipidémie et l'hypertension. Ensemble, ces facteurs définissent le regroupement typique de symptômes du syndrome métabolique et établissent des critères diagnostiques [4].

1.1.3. Les principales causes du syndrome métabolique

1.1.3.1. Les causes génétiques

Il est bien établi que la génétique influence beaucoup les composantes individuelles du syndrome métabolique. Des tendances génétiques vers une forte accumulation de graisses viscérales et de la résistance à l'insuline ainsi que de l'hypertension ont été identifiées [5-

7]. Il est ainsi peu surprenant que des individus venant d'une famille avec une histoire médicale de syndrome métabolique semblent prédisposés à le développer.

Tableau I. Critères diagnostiques du syndrome métabolique selon l'Organisation Mondiale de la Santé et Le National Institute of Health (modifié de Moller et al. 2005)

Caractéristiques cliniques	Critères du NCEP ATPIII* ≥ 3 des critères ci-dessous	Critères de l'OMS Régulation du glucose réduite/résistance à l'insuline et ≥ 2 autres critères
Régulation de la glycémie : réduite/résistance à l'insuline	Glucose plasmatique à jeun ≥ 110 mg/dl	Diabète de type 2 ou glycémie à jeun altérée (≥ 6,1mmol/L) ou tolérance au glucose réduite ou captation de glucose sous le plus bas quartile en conditions hyperinsulinémiques
Obésité abdominale	Circonférence de la taille > 102 cm chez l'homme et > 88 cm chez la femme	Ratio entre la taille et les hanches > 0,90 chez l'homme et > 0,85 chez la femme ou un indice de masse corporelle > 30 kg/m ²
Triglycéridémie	≥ 150 mg/dl	≥ 1,7 mmol/L
HDL -cholestérol	< 40 mg/dl chez l'homme et < 50 mg/dl chez la femme	< 0.9 mmol/L chez l'homme et < 1,0 mmol/L chez la femme
Pression artérielle	≥ 130/85 mm Hg	≥ 140/90 mm Hg
Microalbuminurie	Non inclus	≥ 20 µg/min ou un ratio albumine : créatinine ≥ 30mg/g

* **NCEP ATPIII : National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III**

1.1.3.2. L'obésité

Même si elle n'est pas essentielle au diagnostic, l'obésité semble être une cause importante du syndrome métabolique. Il y a en effet des évidences considérables montrant une relation entre les graisses viscérales et la résistance à l'insuline [8]. Cette relation semble être due au rôle endocrinien des tissus adipeux (figure 1.1), qui est de plus en plus accepté par la

communauté scientifique [9]. En effet, plusieurs des facteurs ainsi sécrétés au sein des tissus adipeux causent la résistance à l'insuline, en bloquant notamment la signalisation par le récepteur d'insuline.

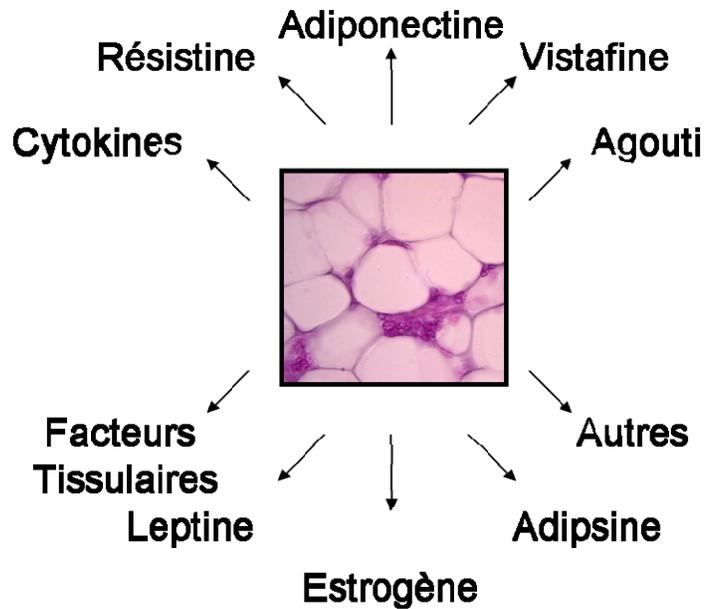


Figure 1.1 Résumé des facteurs sécrétés par les tissus adipeux

1.1.4. Les complications du syndrome métabolique

Le syndrome métabolique constitue un facteur de risque important pour le développement des maladies coronariennes. En effet, il semble que la mort due à une maladie cardiovasculaire est de trois à quatre fois plus probable si la victime est atteinte du syndrome métabolique. De plus, le syndrome métabolique est une étape importante vers le développement du diabète de type 2. Certaines études ont montré que près de 90% des individus ayant le diabète ont aussi le syndrome métabolique [10].

1.2. Le diabète

1.2.1. Généralités

En 1999-2000, 1,2 million de Canadiens étaient atteints d'un diabète ayant été diagnostiqué. Ce chiffre correspond à environ 5% de la population canadienne. Des études récentes suggèrent cependant que ce chiffre est une sous-estimation puisque plus du tiers

des cas de diabète ne sont pas diagnostiqués [11]. Dix ans plus tard, on s'attend à ce que ce nombre atteigne trois millions, représentant près de 10% de la population.

Chaque individu atteint du diabète coûte à la société environ deux à trois fois plus cher que ceux qui n'en sont pas atteints, pour des frais directs variant entre mille et quinze mille dollars par année. Le fardeau fiscal engendré par cette maladie atteint près de quinze milliards de dollars annuellement et ce nombre devrait augmenter d'un tiers encore d'ici 2020. La recherche fondamentale dans le domaine est donc essentielle afin d'obtenir une meilleure compréhension du paradigme que représente le diabète et de permettre le développement de nouveaux traitements individualisés et plus efficaces que ceux qui sont actuellement existants.

1.2.2. Définition

Le diabète est une maladie qui se définit par une production insuffisante ou une utilisation inefficace de l'insuline par le corps humain, ce qui a un impact important sur le taux de glucose sanguin puisque l'insuline est l'hormone responsable de la diminution de celui-ci lorsque la glycémie est trop élevée. Lorsque laissé sans traitement, le taux de glucose sanguin élevé qu'il induit peut causer des complications graves telles que des dommages aux vaisseaux sanguins, une incidence plus élevée de cardiomyopathie et de la cécité.

1.2.3. Les trois types de diabète

Le diabète existe sous trois formes distinctes, dont les causes différentes induisent des symptômes similaires. Ces trois formes sont le diabète de type 1, dit insulino-dépendant, le diabète de type 2, non-insulino-dépendant et le diabète gestationnel.

Le diabète gestationnel est une hyperglycémie observée durant la grossesse. Ses symptômes sont similaires à ceux du diabète de type 2, et celui-ci est souvent dépisté durant des tests prénataux plutôt que par l'observation des symptômes.

Le diabète de type 1 englobe 5 à 10% des cas de diabète observés chez les adultes. Il se caractérise par une incapacité du corps à produire de l'insuline en quantité suffisante. Il est généralement causé par des facteurs environnementaux induisant une réaction auto-immune menant à une perte progressive des cellules bêta du pancréas (responsables de la sécrétion

d'insuline). Ses symptômes incluent une excrétion excessive d'urine, de la soif, une faim constante, de la perte de poids, une modification de la vision et de la fatigue.

Le diabète de type 2 constitue 90 à 95% des cas de diabète diagnostiqués chez les adultes, et bien que ce ne fût pas le cas par le passé, est de plus en plus observés chez les enfants et adolescents obèses. Le diabète de type 2 est une maladie complexe et multifactorielle qui se caractérise par une utilisation inefficace de l'insuline. Loin d'être simple, sa cause est généralement une combinaison de facteurs génétiques, démographiques, environnementaux et comportementaux [12]. Les symptômes sont les mêmes que pour le diabète de type 1, mais la plupart du temps moins marqués. Le mode de vie occidental actuel favorise l'éclosion de ce type de diabète.

1.2.4. Les causes du diabète de type 2

Le diabète de type 2 est une maladie qui est le résultat d'une interaction complexe entre des facteurs génétiques et environnementaux. Les facteurs environnementaux incluent les habitudes de vie ainsi que la diète alimentaire qui joue un rôle d'autant plus important, sachant qu'on observe un taux d'incidence élevé de diabète chez les individus obèses [13]. En effet, les principaux facteurs de risques associés au style de vie sont l'obésité, la sédentarité, l'abus d'alcool et l'usage de cigarettes. La constitution de la diète alimentaire est aussi un contributeur complexe, puisque les différents nutriments, tels que les hydrates de carbone, les types et la quantité de gras et les micronutriments jouent tous un rôle [14]. L'implication des facteurs génétiques est connue, mais moins bien comprise puisque la complexité du diabète rend difficile toute étude de liaison. Cependant, il existe certains groupes de populations chez lesquels on observe une plus grande incidence de la maladie, ce qui a permis l'identification de plusieurs gènes importants. Par exemple, l'incidence du diabète chez les Indiens PIMA aux États-Unis se situe aux environs de 50% [15]. Malgré la participation de tous ces facteurs, le diabète peut être prévenu par l'adoption de bonnes habitudes de vie et d'une meilleure alimentation.

1.3. La résistance à l'insuline

1.3.1. Généralités

La résistance à l'insuline est une des composantes du syndrome métabolique. Elle constitue une première étape vers l'apparition du diabète de type 2 chez les individus touchés. Étant une des conséquences directes de l'obésité, elle peut donc servir de lien entre l'obésité et le diabète [16].

1.3.2. Définition

La résistance à l'insuline se définit comme étant une résistance à l'action cellulaire de l'insuline, qui se caractérise par une inhabilité de l'insuline à inhiber la libération hépatique de glucose dans le sang et à promouvoir l'absorption du glucose plasmatique par les muscles et les tissus adipeux. La résistance à l'insuline est donc un facteur étiologique clé du diabète de type 2.

1.3.3. La signalisation intracellulaire induite par l'insuline

Le principal mode d'action de l'insuline emprunte la voie de signalisation activée par son récepteur. L'action de l'insuline débute avec sa biosynthèse dans le pancréas et se termine avec les effets de l'activation de son récepteur et la voie de signalisation en aval qu'il contrôle.

1.3.3.1. Biosynthèse de l'insuline

L'insuline est synthétisée à partir du gène INS2 dans les cellules bêta du pancréas qui se situent dans les îlots de Langerhans (figure 1.2). La transcription et les manipulations successives de ce gène génèrent un ARN messager codant pour la préproinsuline. En partant de l'extrémité 5', ce transcrit contient les domaines peptidiques B, C et A de la

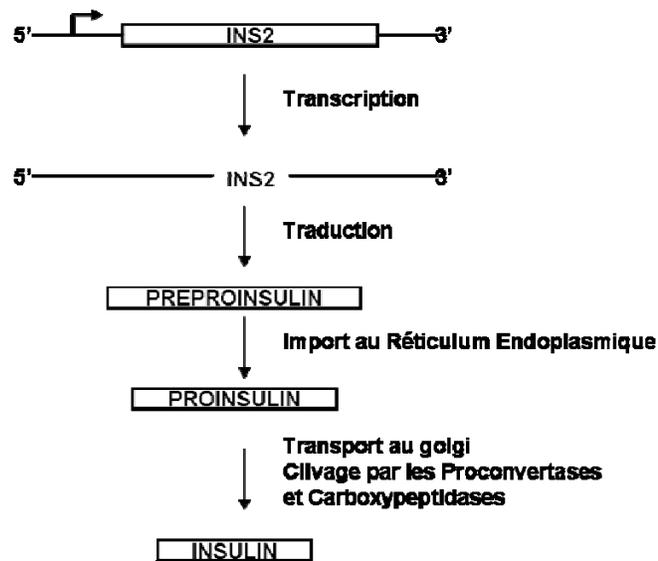


Figure 1.2 Résumé de la biosynthèse de l'insuline

preproinsuline. Alors que la traduction est en cours, la protéine naissante est dirigée vers le réticulum endoplasmique et une séquence signal de 24 acides aminés est clivée. La protéine résultante, la proinsuline, est alors envoyée vers le Golgi où des protéases cliveront la proinsuline retirant de la protéine le peptide C. L'insuline est ainsi une protéine consistant en la combinaison des domaines B et A, qui sont liés ensemble par des liaisons disulfures. La protéine est alors sécrétée par l'entremise de granules de sécrétion où elle est associée au zinc. La vésicule sécrétoire contient de l'insuline, de la proinsuline et du peptide C. Les trois molécules sont libérées par la suite dans la veine porte d'où elles pourront accéder à tout l'organisme.

1.3.3.2. Activation du récepteur d'insuline

Suite à la libération d'insuline dans le sang par le pancréas, celle-ci se lie au récepteur insuline dans différents tissus. La plupart des tissus possèdent une certaine quantité de récepteurs d'insuline, par contre certains, tels que le foie, les tissus adipeux et les muscles en possèdent des quantités très élevées.

Le récepteur insuline est une glycoprotéine hétérotétramérique transmembranaire composée de deux sous-unités alpha et de deux sous-unités bêta. Les sous-unités alpha sont extracellulaires et lient le ligand, alors que les sous-unités bêta sont transmembranaires avec un petit domaine extracellulaire et un grand domaine tyrosine kinase intracellulaire [17]. La liaison de l'insuline sur le domaine extracellulaire du récepteur active son domaine

tyrosine kinase intracellulaire qui peut alors s'autophosphoryler sur plusieurs résidus tyrosine [18]. Bien que l'interaction entre les sous-unités alpha est stabilisée par des ponts disulfures, l'insuline permettrait l'activation du récepteur en augmentant cette stabilité [19].

1.3.3.3. Substrat du récepteur d'insuline

Une fois activé par la liaison d'une molécule d'insuline à la sous-unité alpha du récepteur d'insuline, celui-ci s'autophosphoryle sur plusieurs résidus tyrosine cytosoliques de sa sous-unité bêta. Ces résidus tyrosines phosphorylés sont alors reconnus par des protéines possédant des domaines pouvant interagir avec les phosphotyrosines. Les deux domaines les plus courants pouvant remplir cette fonction sont les domaines PTB et SH2 [20, 21]. Parmi les différentes protéines pouvant interagir avec des résidus phosphotyrosines présents sur la sous-unité bêta du récepteur d'insuline on retrouve les protéines de la famille IRS dont les deux principales composantes sont IRS1 et IRS2. Ces protéines se caractérisent principalement par la présence d'un domaine PTB et d'un domaine PH ainsi que d'une multitude de sites de phosphorylations sur tyrosine et sur sérine [22-24].

En général, les phosphorylations sur sérines et tyrosines des protéines IRS jouent un rôle antagoniste les unes par rapport aux autres. En effet, il est généralement accepté que la phosphorylation sur sérine inactive ou empêche l'activation des IRS alors que les phosphorylations sur tyrosines sont activatrices [25]. Cela est principalement dû au fait que le rôle des IRS serait comme un site d'attache des protéines en aval du récepteur d'insuline dans la voie de signalisation, qui interagissent avec IRS1 et IRS2 par le biais de domaines SH2 et PTB [26]. Donc, la phosphorylation sur tyrosine des protéines IRS permet le recrutement à la membrane plasmique des protéines en aval de la voie de signalisation.

La figure 1.3 résume le rôle des différents sites de phosphorylation des protéines IRS.

1.3.3.4. Transduction du signal insulinique – de la PI3K à Akt

L'insuline agit en phosphorylant des motifs spécifiques sur IRS1 et IRS2 ce qui facilite le recrutement des sous-unités régulatrices de la PI3K via leur site SH2 (figure 1.4) [27]. Il y a un recrutement différentiel des sous-unités de la PI3K et de leur variante selon le complexe IRS [28, 29]. Le recrutement de ces sous-unités par le substrat du récepteur d'insuline

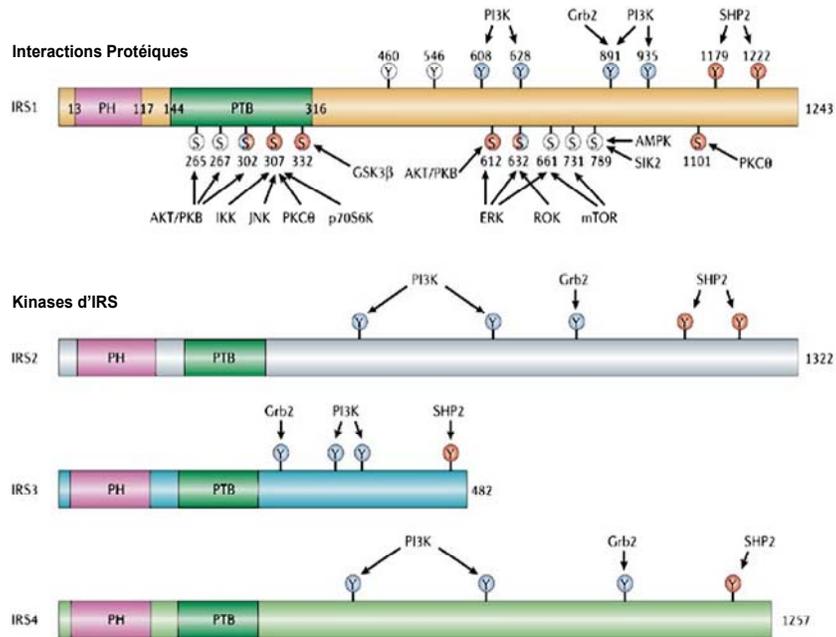


Figure 1.3 Sites d'interactions et de phosphorylations des protéines IRS (Adapté de *Taniguchi et al. 2006 [30]*)

résulte en la translocation des sous-unités catalytiques (p110) à la membrane où se situe le substrat de la PI3K [31, 32]. Une fois recrutée à la membrane, la sous-unité catalytique convertit des molécules de phosphatidyl inositol-3,4-biphosphate en phosphatidyl inositol-3,4,5-triphosphate (PIP3) en phosphorylant ces lipides membranaires [33]. Deux phosphatases contrebalancent l'activité des PI3K : PTEN et SHIP [34, 35]. Les molécules PIP3 résultants de l'action de PI3K permettent le recrutement à la membrane d'autres protéines possédant un domaine PH [36]. Dans le cas de la voie de signalisation du récepteur d'insuline, ces protéines sont les kinases PDK1 et PDK2. Une fois activée, PDK1 phosphoryle et active la protéine kinase Akt une des protéines clé de la voie de signalisation par l'insuline [37, 38]. L'activation d'Akt se fait d'abord par la phosphorylation de son résidu thréonine 308, situé sur sa boucle d'activation puis par la phosphorylation subséquente du résidu serine 473 [39, 40]. Une fois activé, Akt

phosphoryle et modifie l'activité d'une multitude de protéines telles que des facteurs de transcription, mTOR et GSK3 [41].

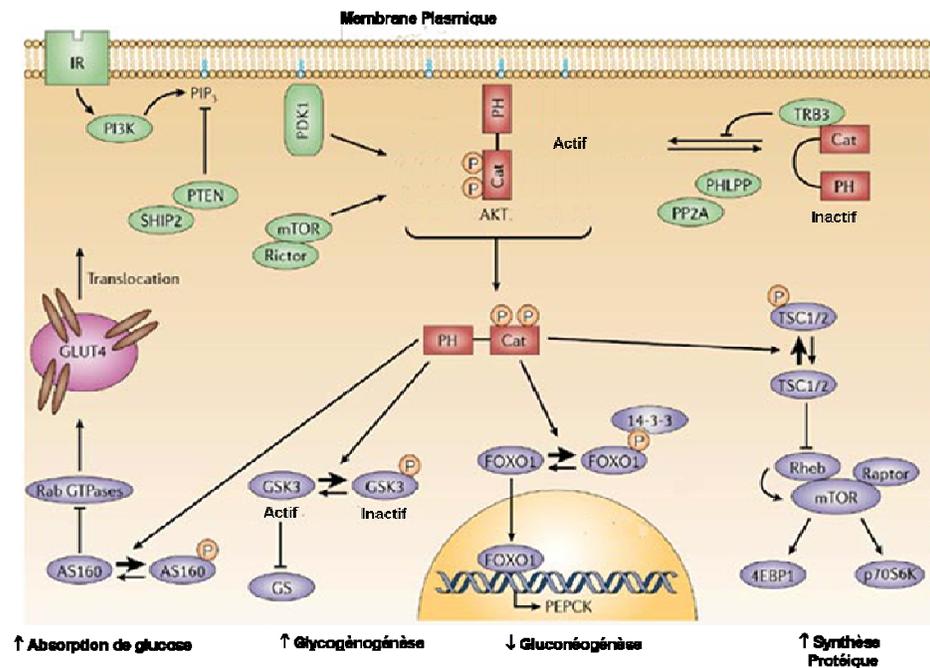


Figure 1.4 Transduction du signal par la voie de signalisation du récepteur insuline (adapté de Taniguchi et al. 2006 [30])

1.3.3.5. Effet de l'insuline sur le foie, les tissus adipeux et les muscles

En général, l'insuline promet l'absorption du glucose par les tissus périphériques via la translocation des transporteurs de glucose [42]. Cette étape se fait suite à l'activation d'Akt en réponse à la stimulation des cellules par l'insuline. Akt phosphoryle et donc inactive la protéine AS160 qui normalement inhibe la translocation à la membrane du transporteur de glucose Glut4, permettant ainsi l'entrée du glucose plasmatique dans la cellule [30]. C'est par exemple le cas dans les muscles et les tissus adipeux. Par contre, le foie étant un site important de libération de glucose dans le sang, le rôle primaire de l'insuline par rapport à cet organe est de stopper cette sécrétion de glucose hépatique en inhibant la glycogénolyse et la gluconéogénèse [43].

1.3.4. Les mécanismes de la résistance à l'insuline

Du point de vue de la biologie moléculaire, la résistance à l'insuline dépend de l'action de deux classes de protéines qui auront une action sur la signalisation par le récepteur insuline. Celles-ci sont les protéines tyrosines phosphatases, ou PTPs, et les sérine/thréonine kinases. De façon générale, elles agissent en modulant le niveau de phosphorylation des différentes protéines composant la voie de signalisation du récepteur insuline.

1.3.4.1. L'importance des PTPs dans la résistance à l'insuline

On se rappellera que plusieurs étapes dans la signalisation du récepteur à l'insuline dépendent de la phosphorylation sur tyrosine des protéines impliquées par celles-ci. Notamment, au niveau du récepteur d'insuline et de son substrat qui sont toutes deux phosphorylées par le récepteur sur des résidus tyrosines lors de l'activation de la voie. Il est donc logique de considérer les PTPs comme un médiateur cellulaire important de la résistance à l'action de l'insuline.

De par leur localisation à la membrane plasmique, les récepteurs protéine tyrosine phosphatases jouent un rôle important à ce niveau. En effet, certaines de ces PTPs comme LAR et rPTP α s'associent au récepteur insuline [44, 45]. Il est à noter par contre que bien qu'il soit démontré que LAR puisse s'associer au récepteur insuline, son rôle dans la modulation de son activité reste à déterminer de façon certaine.

La protéine tyrosine phosphatase 1B de son côté semble jouer un rôle plus important dans la signalisation par le récepteur insuline. En effet, des études de mutagenèse dirigée du site actif de la protéine ont montré que celle-ci s'associe avec le récepteur insuline par son site actif [46, 47]. De plus, il a été démontré que PTP-1B peut s'associer à IRS1 suggérant qu'elle peut réguler la voie de signalisation de l'insuline à plus qu'un niveau [48]. Des études de délétion de PTP-1B chez la souris ont montré qu'elle déphosphoryle effectivement le récepteur d'insuline et que le niveau de phosphorylation d'IRS1 y est aussi augmenté. Il faut noter cependant que la relation entre PTP-1B et IRS1 n'est pas encore établie [49, 50].

1.3.4.2. Le rôle des sérine/thréonine kinases dans la résistance à l'insuline

L'autre classe de protéines jouant un rôle important dans la résistance cellulaire à l'action de l'insuline est celle des sérine/thréonine kinases. Contrairement au cas des PTPs où

l'action des PTPs sur la signalisation par le récepteur d'insuline est plutôt ponctuelle, l'activité des kinases modulant cette voie est plus organisée, celles-ci faisant la plupart du temps partie d'une voie de signalisation différente et donc agissant en réponse à différents facteurs intra et extra cellulaires.

Le point commun central de toutes ces kinases consiste en les substrats de récepteur d'insuline (IRS). En effet, alors que la phosphorylation d'IRS1 sur résidus tyrosines permet la transduction du signal en aval de la voie, sa phosphorylation sur sérine joue généralement un rôle inhibiteur [25]. Ceux-ci se retrouvent pour la plupart sur le domaine PTB d'IRS1 et donc leur phosphorylation a comme effet principal d'inhiber l'association d'IRS1 au récepteur insuline. L'étude des kinases d'IRS1 est donc importante à la compréhension des mécanismes induisant la résistance à l'insuline.

Les kinases phosphorylant IRS1 sur sérine (figure 1.5) font généralement partie de trois voies de signalisation, soit celle des Stress-Activated Protein Kinases (SAPKs) une branche de la voie des Mitogen-Activated Protein Kinases (MAPKs), celle de la protéine PKC en réponse au facteur de tumeur nécrotique isoforme α (TNF α) et celle de la mammalian Target Of Rapamycin (mTOR).

Les différents stress cellulaires induisent la phosphorylation sur les résidus sérine et thréonine des IRS par l'entremise de la voie des SAPKs, principalement par l'action de la c-Jun N-terminal Kinase (JNK) [51-54]. Cette voie est activée en réponse à divers facteurs extracellulaires associés au stress. En effet, le TNF α , les Interleukines, les acides gras plasmatiques et même l'action prolongée de l'insuline sont capables d'activer la voie de signalisation par JNK. Certaines voies intracellulaires peuvent aussi inhiber la signalisation par le récepteur insuline, telles que les voies du stress du réticulum endoplasmique qui lorsque la capacité cellulaire à synthétiser des protéines sécrétées ou transmembranaires est inférieure à la charge imposée, ou encore en réponse à une perturbation du calcium intracellulaire active la signalisation par les SAPKs et en parallèle inhibe l'action du récepteur insuline au niveau des IRS.

1.3.5. Rôle de l'obésité dans la pathogenèse de la résistance à l'insuline

Il a été mentionné plus tôt que certaines molécules présentes dans l'organisme peuvent causer une résistance cellulaire à l'insuline. La plupart de ces molécules, bien que de nature différente semblent emprunter des mécanismes semblables dans l'induction de la résistance

à l'insuline. De plus, elles semblent pour la plupart prendre racine dans les tissus adipeux, qui de plus en plus sont reconnus comme des tissus endocriniens. En effet, ceux-ci sont le foyer de sécrétion accru de facteurs inflammatoires, d'acides gras et d'adipokines, des hormones propres aux tissus adipeux [9].

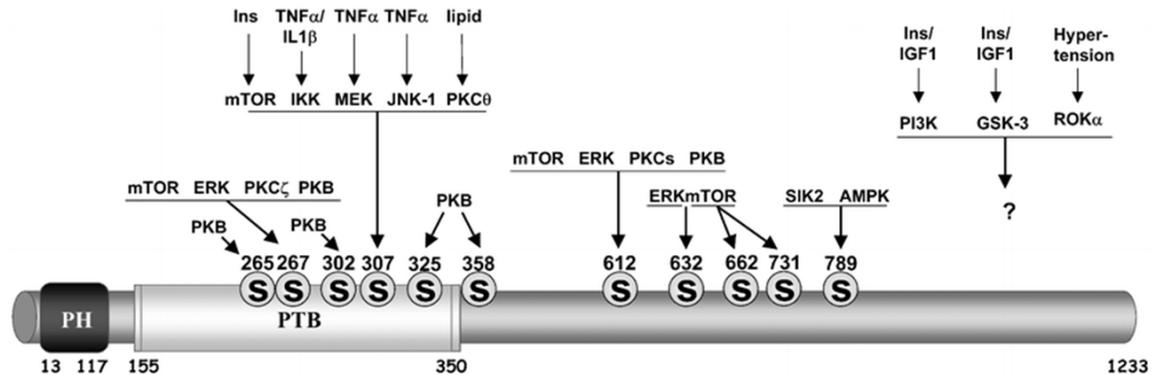


Figure 1.5 Résidus sérine/thréonine phosphorylés sur IRS1 en réponse à différents facteurs. (adapté de Gual et al. 2005 [25])

1.3.5.1. Les acides gras libres

Il a depuis longtemps été reconnu que les individus obèses possèdent une concentration plasmatique en acides gras libres très élevée, fait principalement dû à une plus grande masse adipeuse chez ces individus [55-57]. Bien que l'importance des acides gras dans la résistance à l'insuline est connue depuis longtemps, ce n'est que récemment qu'il a été montré que ceux-ci provoquaient cet effet en modifiant l'absorption du glucose plutôt que son métabolisme [58, 59]. Le modèle actuel de la résistance à l'insuline induite par les acides gras attribue un rôle signalétique aux acides gras libres et leurs métabolites. Il est cependant à noter que l'effet des acides gras sur la voie de signalisation du récepteur d'insuline varie selon la nature de l'acide gras en question. En effet, des acides gras saturés tels que de l'acide palmitique induiront généralement la résistance à l'insuline, alors que des acides gras insaturés comme l'acide oléique auront un effet contraire [60, 61]. Ces effets sont médiés par l'activation de diverses voies de stress qui résultent en la phosphorylation des IRS sur des résidus sérine.

La forte concentration d'acides gras plasmatiques retrouvée chez les individus obèses est une des causes principales de la résistance à l'action de l'insuline des tissus périphériques observée chez ceux-ci. Les acides gras saturés tels que l'acide palmitique peuvent pénétrer

les cellules de façon passive puis être convertis en diacylglycérol. Ce diacylglycérol peut alors activer la protéine kinase C θ [62]. Une fois activée, la PKC active à son tour d'autres kinases telles que la Mixed Lineage Kinase 3 (MLK3) qui va alors activé JNK [63] ou IKK [64] qui peuvent toutes deux phosphoryler IRS1 sur son résidu sérine 307 et ainsi stopper la transduction du signal par IRS1 [51, 65]. Une autre voie pouvant possiblement expliquer l'action de ces acides gras sur la signalisation du récepteur insuline passerait par l'activation de récepteurs intracellulaires aux acides gras. Il existe en effet plusieurs récepteurs couplés aux protéines G orphelins auxquels les acides gras libres peuvent se lier et quelques-uns parmi ceux-ci, tel que GPR40, GPR41 et GPR43 sont connus pour être impliqués dans le contrôle de l'homéostasie du glucose à différents niveaux (contrôle de la sécrétion de l'insuline et de la production de la leptine) [66].

1.3.5.2. Les Agents Inflammatoires

Les agents inflammatoires tels que le TNF α et les interleukines peuvent induire la résistance à l'action de l'insuline [67, 68]. Ces molécules sont sécrétées par les lymphocytes présents en grande quantité dans les tissus adipeux d'individus obèses. Ceux-ci agissent par le biais des voies de signalisations de leurs récepteurs cellulaires, qui généralement vont activer les kinases JNK et IKK en aval de leurs voies de signalisations [53].

1.3.5.3. Le stress du réticulum endoplasmique

Le stress du réticulum endoplasmique est une autre voie qui peut inhiber la signalisation par le récepteur insuline [69]. Le rôle premier de cette voie est de veiller au bon fonctionnement du réticulum endoplasmique lors de la synthèse protéique. Elle est activée lorsque celui-ci se retrouve avec une charge supérieure à sa capacité, ce qui correspond en général à une accumulation de protéines mal repliées retenues dans le réticulum endoplasmique. Dans cette situation, les voies de stress du RE sont activées et celles-ci induisent alors l'arrêt de la synthèse protéique au niveau de la traduction et l'expression de chaperones moléculaires et autres protéines pouvant aider à alléger la charge du RE. Cependant, si le stress du RE est trop intense et/ou dure trop longtemps, les voies du stress du RE induiront l'apoptose des cellules atteintes.

Trois voies de signalisation sont activées en réponse au stress du RE (figure 1.6). La première voie activée est celle de PERK (*PKR-like ER-associated protein kinase*) qui halte

complètement la traduction classique suite à la phosphorylation de la sous-unité α du facteur d'initiation de la traduction eIF2. La deuxième voie activée est celle d'ATF6. ATF6 est un facteur de transcription transmembranaire résidant au RE. Le clivage d'ATF6 permet la libération d'un fragment d'environ 50kDa qui migre ensuite dans le noyau afin d'induire l'expression de gènes ne requérant pas la machinerie de traduction classique. Enfin, la troisième voie activée est celle d'IRE-1. Généralement, l'activation de cette voie est tardive et induit l'apoptose de la cellule suite à un stress de RE prolongé. Une des voies activées dans ce but est celle des SAPK par l'entremise de TRAF2 et ASK1 et donc de JNK ce qui a pour conséquence d'inhiber la signalisation par le récepteur insuline [69, 70].

1.3.5.4. Autres hormones Adipeuses

Les tissus adipeux furent longtemps considérés comme étant des organes servant uniquement à l'entreposage des graisses. Ce n'est qu'au début des années 90 que cet axiome fut remis en question par la découverte de la leptine, une protéine de 16 kDa sécrétée par les tissus adipeux [71]. À partir de ce point, on attribua aux tissus adipeux un rôle plus dynamique au sein de l'organisme, c'est-à-dire un rôle endocrine. Par la suite, d'autres études visant à identifier des facteurs sécrétés par les tissus adipeux ont permis d'établir qu'environ 20% des transcrits totaux générés par les adipocytes sont des protéines sécrétées [72].

Plusieurs de ces facteurs sécrétés par les tissus adipeux sont associés d'une façon ou d'une autre au syndrome métabolique. Leur rôle et par conséquent leur action varient largement selon le facteur. Le premier facteur identifié, la leptine induit des dérangements métaboliques dramatiques lorsque déléetée. Son rôle principal est de communiquer au système nerveux central le remplissage des réserves d'énergie du corps, induisant une réduction de l'appétit et permettant l'augmentation des dépenses énergétiques du corps [73-75].

L'adiponectine est un facteur présent en très grande quantité dans le système sanguin. Cependant, chez les individus obèses, son niveau est diminué ce qui semble associé à l'augmentation de la résistance à l'insuline chez ceux-ci. En effet, l'injection d'adiponectine à des modèles animaux améliore de façon significative la résistance à l'insuline [76-78].

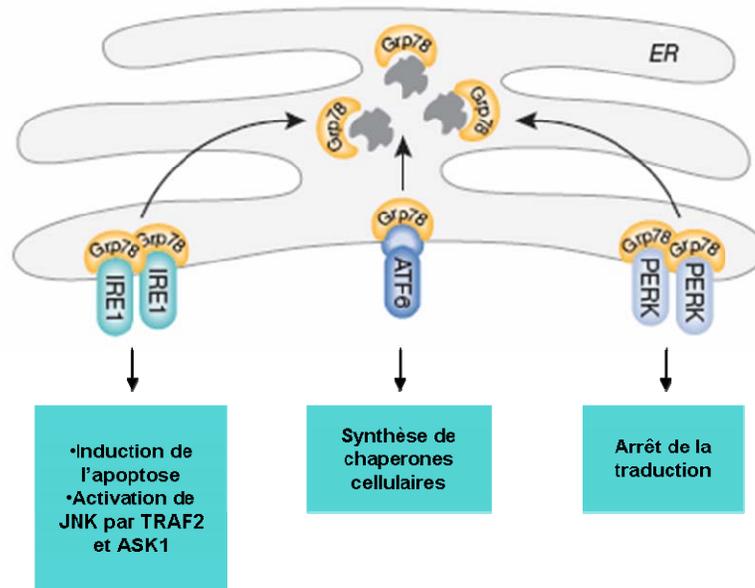


Figure 1.6 Voies de signalisations induites par le stress du réticulum endoplasmique (adapté de *Szegezdi et al. 2006 [70]*)

Enfin, la résistine est un autre facteur sécrété par les adipocytes et associé de façon directe à la résistance à l'insuline. En effet, des études ont montré que l'injection à des souris obèses et résistantes à l'insuline d'anticorps contre la résistine permet de rétablir un niveau acceptable de glucose et améliore l'action d'insuline exogène injectée à celles-ci. Par ailleurs, il a été montré que des modèles de souris plus sensibles à l'insuline expriment un plus faible niveau de résistine [79].

1.4. Les protéines phosphatases

La phosphorylation est une modification réversible à la base du contrôle de plusieurs processus cellulaires. Elle s'effectue sur des acides aminés particuliers, tels que les sérines, thréonines, tyrosines et même histidines ainsi que sur certains lipides [80]. De plus, cette modification est d'une importance telle que plus de 30% des protéines intracellulaires sont des phosphoprotéines et 4% du génome eucaryote code pour des kinases et des phosphatases, enzymes dont le rôle est de moduler l'état de phosphorylation des protéines et des lipides [81]. Les protéines kinases et phosphatases sont responsable du maintien de l'équilibre intracellulaire entre les deux activités opposées de phosphorylation et de déphosphorylation, respectivement. Alors que les protéines kinases jouaient un rôle de

premier plan dans la cellule, on reléguait aux protéines phosphatases un rôle plutôt mineur dans l'homéostasie cellulaire. En effet, jusqu'à récemment, il était globalement accepté que les phosphatases jouaient plutôt un rôle d'entretien, responsable de « nettoyer » derrière les protéines kinases. On sait maintenant que ces protéines jouent un rôle plus important que cette fonction passive que l'on lui attribuait.

1.4.1. Les cinq grandes familles de protéines phosphatases

Les protéines phosphatases se divisent en cinq familles selon le type de substrat qui leur est spécifique. Dans ces cinq familles, celles-ci sont sous-divisées selon leurs structures secondaires et tertiaires.

1.4.1.1. Les Protéines Tyrosine Phosphatases

Les protéines tyrosine phosphatases forment la plus grande famille de phosphatases et se caractérisent par un domaine et un mécanisme catalytique hautement conservés et plus spécifiquement par un motif HCX₅R qui constitue le motif signature des PTP, où la cystéine joue un rôle essentiel dans la catalyse. Leurs substrats sont retrouvés dans la plupart des voies de signalisations et processus physiologiques. Les récepteurs tyrosine kinase par exemple forment le groupe de substrats les plus notoires des PTPs [82].

1.4.1.2. Les Phosphatases à lipides

L'importance des lipides et surtout des phospholipides comme seconds messagers dans la transduction de signal fait des phosphatases à lipides un groupe de protéine phosphatase plus connu que les histidines phosphatases. Elles modulent la plupart du temps l'initiation des voies de signalisations puisque c'est à cette étape que les lipides sont impliqués [83].

1.4.1.3. Les Histidine Phosphatases

Les histidines phosphatases forment une famille de phosphatases qui semblent principalement jouer un rôle métabolique. Elles sont néanmoins impliquées dans la modulation des voies de signalisations malgré leur activité peu commune. Leur séquence et leur site catalytique sont bien conservés [84].

1.4.1.4. Les Phosphatases à double spécificité

Les phosphatases à double spécificité sont des phosphatases pouvant agir à la fois en tant que protéine tyrosine phosphatase ou en tant que sérine/thréonine phosphatase. Elles sont considérées comme un sous-groupe des protéines tyrosines phosphatases puisque leur activité première semble être celle d'une PTP. Elles sont connues pour cibler en général les protéines des voies MAP Kinase et de la signalisation immunitaire [85].

1.4.1.5. Les Sérine/Thréonine Phosphatases

Les Sérine/Thréonine Phosphatases forment, avec les PTPs, la plus grande famille de phosphatases. Elle est caractérisée par les complexes multimériques que forment en général les sérine/thréonine phosphatase. Elle se divise en quatre sous-familles, c'est-à-dire les protéines phosphatases 1, les protéines phosphatases 2A, les protéines phosphatases 2B et les protéines phosphatases 2C. L'organisation multimérique de ces phosphatases permet une régulation plus complexe de leur activité. Par contre, contrairement aux autres phosphatases de cette famille, les protéines phosphatases 2C sont des protéines monomériques possédant une seule unité qui catalyse la déphosphorylation de leurs substrats.

1.4.1.5.1. Les protéines phosphatases 1 (PP1)

La protéine phosphatase 1 (PP1) est la mieux conservée des protéines phosphatases chez les cellules eucaryotes. Il existe chez les mammifères trois gènes encodant des isoformes de la protéine phosphatase 1, soit PP1 α , PP1 β/β et PP1 γ . De plus, le gène encodant PP1 γ peut être épissé de deux façons différentes et ces différentes isoformes sont exprimées de façon différentielle dans tout l'organisme [86-88]. Les unités catalytiques des PP1 n'existent pas librement dans la cellule, mais s'associent plutôt avec différents peptides régulateurs formant ainsi une multitude d'holoenzymes multimériques distinctes ayant des spécificités de substrat très différentes [89].

1.4.1.5.2. Les protéines phosphatases 2A (PP2A)

De façon similaire à PP1, PP2A est une protéine hétérotrimérique formée de l'association d'un hétérodimère à des sous-unités régulatrices variables [90-92]. Cet hétérodimère est formé de la sous-unité catalytique de PP2A et de PR65/A qui agit à titre de sous-unité régulatrice constante dont le rôle serait celui d'une protéine d'échafaudage recrutant une

seconde unité régulatrice au complexe [93]. Ces deux sous-unités existent chacune sous deux isoformes, nommées α et β . Les deux isoformes de la sous-unité catalytique proviennent de gènes distincts qui conservent quand même environ 97% d'identité [94]. Ainsi, cette organisation du complexe permet à PP2A de jouer un rôle très large dans la cellule. Elle peut ainsi moduler le cycle cellulaire [95-97], l'activité de plus de 30 protéines kinases impliquées dans la transduction de signal d'une multitude de voies de signalisations (telles que l'axine, GSK3, JAK2, etc.) [98] et l'activité de facteurs de transcriptions tels que CREB [99, 100] et c-Jun [101].

1.4.1.5.3. La protéine phosphatase 2B (PP2B)

La calcineurine, la principale protéine phosphatase de type 2B est un hétérodimère composé d'une grande sous-unité catalytique et d'une petite sous-unité régulatrice liant la calmoduline. Ainsi, son activité est modulée par le calcium intracellulaire et la calmoduline [102, 103]. Elle est ubiquitaire, par contre son expression est beaucoup plus forte dans les tissus neuronaux [104]. En général, elle module l'activité de protéines importantes dans différentes voies de signalisation parmi lesquelles figurent la NO synthase, la dynamine, le facteur de transcription Elk-1, le facteur tau, hsp25 et le récepteur NMDA [105-110].

1.4.1.5.4. La protéine phosphatase 2C (PP2C)

La protéine phosphatase 2C est, contrairement aux autres sérine/thréonine phosphatases une protéine monomérique [111, 112]. Son activité dépend de la présence de Mg^{2+} [113] et ses substrats jouent en général un rôle important dans la transduction de signal ou les voies métaboliques.

1.5. La Protéine Phosphatase Magnésium-dépendant 1A (PPM1A)

La Protéine Phosphatase Magnésium-dépendant 1A ou PPM1A, aussi connue sous le nom de protéine phosphatase 2C isoforme α (PP2C α) constitue l'isoforme la plus étudiée de la protéine phosphatase 2C. Elle est une petite protéine, d'une taille de 43 kDa, et existe sous deux variantes produites du même gène.

1.5.1. Clonage et identification de PPM1A

PP2C fut originalement purifiée des muscles de lapin en 1987 [114]. L'isoforme longue de PPM1A fut clonée deux ans plus tard à partir de reins de rats alors que ce n'est qu'en 1992 que son isoforme courte fut clonée et séquencée [115, 116].

1.5.2. Structure et localisation du gène encodant PPM1A

Malgré sa petite taille et en conséquence la petite taille de son cDNA, PPM1A est le produit d'un gène de 10kbp situé sur le chromosome 14q22 [117]. L'alignement de l'ADN complémentaire dont la protéine est issue à l'ADN génomique du gène révèle la présence de cinq exons et de quatre introns dans le cadre de lecture ouvert (figure 1.7). La structure du gène montre que le premier exon est massif comparativement aux autres (800 paires de bases contre 29 à 117 paires de bases). De plus, la partie 5' non traduite du gène est structurée d'une façon particulière. En effet, elle est divisée en deux parties séparées par plus de 33 000 paires de bases. De plus, la variante courte de PPM1A possède environ 100 paires de bases de plus dans sa partie non traduite se situant exactement au centre des deux sites d'épissage. Cette particularité suggère l'existence d'un phénomène d'épissage alternatif de la partie 5' non-traduite.

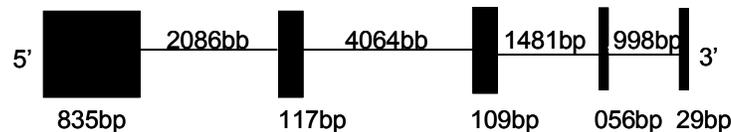


Figure 1.7 Structure génomique de PPM1A

1.5.3. Contrôle de l'expression de PPM1A

Les mécanismes contrôlant l'expression de PPM1A sont à ce jour peu étudiés. Son rôle dans l'organisme étant encore flou, la plupart des études en sont encore à l'étape de comprendre le rôle de la protéine. Pourtant, certaines études jettent de la lumière sur cet aspect de l'activité de PPM1A. Par exemple, il a été montré que son expression chez la souris est ubiquitaire. De plus, on sait que sa localisation intracellulaire est cytoplasmique et nucléaire, ce qui s'explique en partie par sa petite taille, lui permettant de diffuser

librement au travers des complexes de ports nucléaires [118, 119]. Au niveau du contrôle de son expression, certaines études ont montré que le sphingoside-1-phosphate (S1P), le TNF α ainsi que l'IL-6 diminuent l'expression de PPM1A dans des cellules en culture. Les protéines impliquées dans cette régulation et les mécanismes sous-jacents ne sont pas encore élucidés [120, 121].

1.5.4. La structure de PPM1A

Il a été mentionné plus tôt que contrairement aux autres sérine/thréonine phosphatases, PPM1A est une protéine monomérique. Il en découle donc que sa structure est plus simple et que toute son activité ainsi que la régulation de celle-ci sont combinées dans une seule sous-unité. Ces attributs de PPM1A fournissent néanmoins peu d'information visant à aider la compréhension de son fonctionnement et en conséquence de son rôle dans la cellule.

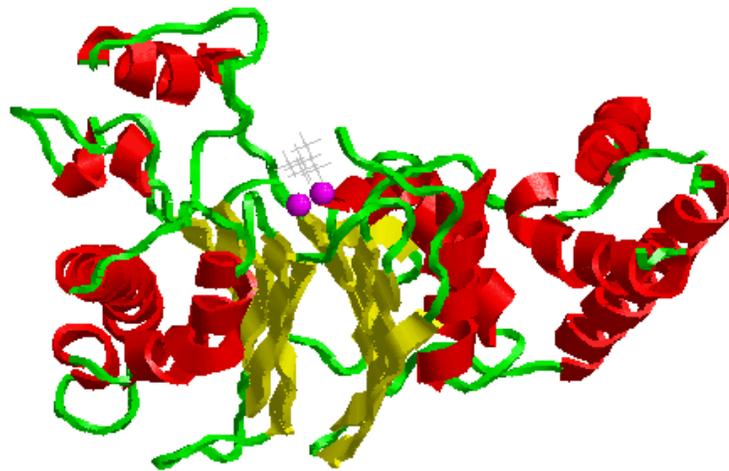


Figure 1.8 Structure tridimensionnelle de PPM1A obtenue par cristallographie avec diffraction aux rayons X (Généré à partir des structures cristallographiques obtenues par *Das et al.* [111])

L'étude de sa structure tertiaire, telle qu'obtenue par la cristallographie par diffraction aux rayons X (figure 1.8) permet de comprendre plusieurs éléments importants associés à son mécanisme catalytique [111]. Deux de ceux-ci, en particulier, retiennent l'attention. D'abord, il était déjà connu que PPM1A nécessite la présence d'ions Mg²⁺ afin de posséder une activité optimale. Ceux-ci se trouvent au cœur du site actif de la protéine. Le site actif consiste en deux feuillets bêta antiparallèles entourés d'hélices alpha tournées vers le milieu intracellulaire. Une séquence n'adoptant pas de structure secondaire particulière en

extrémité C-terminale de la protéine n'est pas représentée dans cette figure puisqu'elle rendait la cristallisation très difficile voir impossible selon les auteurs.

Lorsque la structure est représentée sous forme de surface dans l'espace (figure 1.9), il est possible de constater que le site catalytique (en orange) est enfoui dans la protéine et forme ainsi une pince. Cette pince doit certainement participer à l'interaction entre PPM1A et son substrat et donc jouer un rôle dans la sélectivité de la phosphatase. Au cœur de ce site se retrouvent les deux ions Mg^{2+} qui jouent un rôle fort important dans l'activité phosphatase de PPM1A. La queue en repliements aléatoires qui ne fût pas cristallisée est suffisamment longue pour lui permettre de recouvrir le site actif si nécessaire, suggérant un mécanisme modulateur intrinsèque à la protéine.

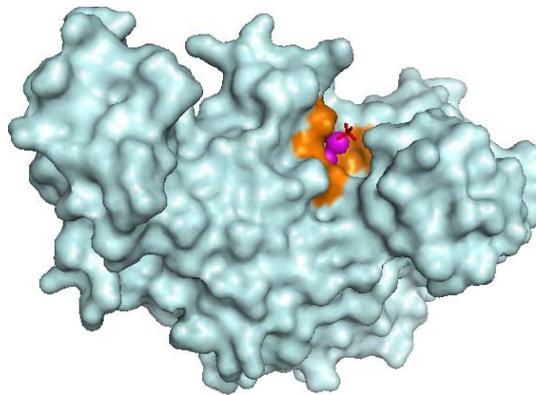


Figure 1.9. Représentation de PPM1A sous forme de surface dans l'espace (Généré à partir des structures cristallographiques obtenues par *Das et al.* [111])

1.5.5. Le mécanisme catalytique de PPM1A

Une partie de la compréhension du rôle de PPM1A passe par l'étude de son mécanisme catalytique. En effet, la connaissance de cet élément peut permettre l'élaboration d'inhibiteurs pharmacologiques spécifiques à la protéine ainsi que la création des protéines mutantes ayant toutes sortes d'utilités en recherche. À priori, des études cinétiques de l'enzyme ont montré que son mécanisme est séquentiel, l'enzyme devant d'abord lier des cations divalents au sein de son site actif avant de procéder à la déphosphorylation du substrat. Son activité semble de plus être optimale à un pH aux environs de 8 [122]. Ensuite, une étude récente utilisant des mutants de PPM1A a mis de l'avant un mécanisme catalytique pour l'enzyme (figure 1.10) basé sur le haut degré de conservation de la

protéine et plus spécifiquement des résidus au site actif [123]. L'activité phosphatase de PPM1A dépend de la coordination au site actif de deux cations divalents et des atomes de Mg^{2+} . Ces ions sont stabilisés au site actif par les chaînes latérales de deux acides aspartiques (Asp 60 et Asp 239) ainsi que le carbonyle du lien peptidique de la glycine 61. Ces deux cations divalents sont alors en mesure de retenir des molécules d'eau au cœur du site actif. Une de ces molécules est alors activée par la chaîne latérale d'un troisième acide aspartique (Asp 282) créant ainsi une charge partielle négative sur l'oxygène de la molécule d'eau et une charge partielle positive sur un des hydrogènes. Cela permet alors à la molécule d'eau de procéder à une attaque nucléophile sur le phosphate du substrat qui est positionné très près du cœur métallique de l'enzyme par l'entremise de ponts hydrogènes et d'une interaction électrostatique avec l'arginine 33. Cette réaction suit le schéma mécanistique de la substitution nucléophile S_N2 , qui se produit en une seule étape dont la

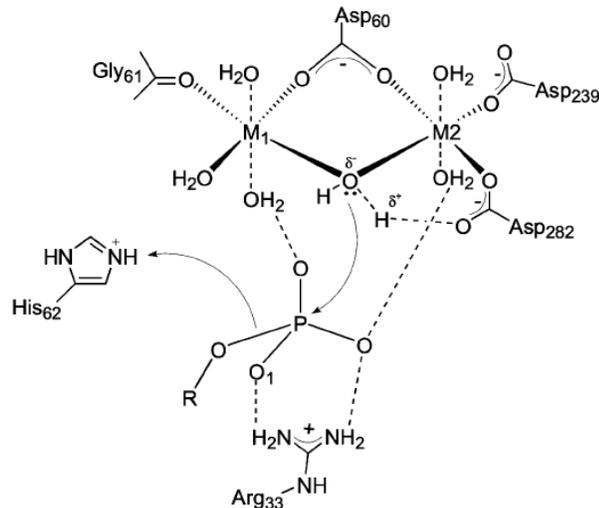


Figure 1.10. Mécanisme possible de la déphosphorylation d'une sérine/thréonine par PPM1A (tirée de Jackson *et al.* [123])

cinétique dépend des deux molécules. Cette étape de la réaction enzymatique est facilitée par la protonation du phosphate par la chaîne latérale de l'histidine 62, celle-ci agissant à titre d'acide général durant la catalyse.

1.5.6. Contrôle de l'activité de PPM1A

Hormis la régulation de son expression, deux éléments semblent importants à la régulation de l'activité catalytique de PPM1A. D'abord, il y a la localisation cellulaire de l'enzyme.

Bien que présente au noyau et au cytosol, une étude de la séquence de PPM1A semble révéler un site de myristoylation en extrémité N-terminale pouvant forcer sa localisation à la membrane plasmique [124]. Ensuite, en extrémité C-terminale, on retrouve un site de phosphorylation pour la Caséine Kinase II dont la séquence serait SASTDD. Cette extrémité correspond à une partie de séquence qui n'adopte aucune structure particulière et qui pourrait ainsi agir à titre de queue mobile dont la conformation dépendrait de l'état de phosphorylation de la protéine. La Caséine Kinase II est une sérine/thréonine kinase qui est constitutivement active. Il a d'ailleurs été montré *in vitro* que PPM1A est phosphorylée sur son extrémité C-Terminale [125]. Cependant, l'effet de cette phosphorylation sur l'activité de la protéine reste encore inconnu. Cela suggère donc que le principal mécanisme de régulation de PPM1A serait l'état de phosphorylation de son extrémité C-terminale.

1.5.7. Le Rôle de PPM1A

1.5.7.1. Régulation du stress énergétique

Un des premiers substrats identifiés pour PPM1A est l'AMP Activated Protein Kinase, communément appelée AMPK (figure 1.11) [126]. La voie de signalisation de l'AMPK est activée par des événements cellulaires qui soit inhibent la biosynthèse d'ATP, ou accélère la consommation de celui-ci. Cette diminution de la quantité d'ATP se traduit par une augmentation du ratio AMP : ATP, qui est responsable de l'activation de l'AMPK. En effet, l'augmentation du ratio AMP : ATP induit la phosphorylation de l'AMPK sur la thréonine 172, l'activant ainsi. On peut donc considérer l'AMPK comme un senseur de l'énergie intracellulaire [127, 128]. Une fois activée, l'AMPK inhibera dans un premier temps les voies de biosynthèse (telle que la synthèse protéique) nécessitant la consommation de l'ATP afin de faciliter le retour à un équilibre cellulaire AMP : ATP [129, 130]. Ensuite, son activation favorisera les voies cataboliques générant de l'ATP comme la β -oxydation des acides gras et augmentera l'absorption du glucose plasmatique par la cellule [131, 132].

Ainsi, PPM1A, en déphosphorylant l'AMPK désactiverait celle-ci et favoriserait un retour à l'activité normale de la cellule.

Un autre substrat potentiel de PPM1A associé au métabolisme est l'Hormone Sensitive Lipase (HSL) qui peut elle-même être phosphorylée par l'AMPK lorsqu'un besoin énergétique cellulaire se fait sentir [133, 134].

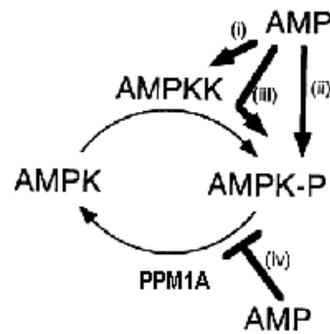


Figure 1.11 Modulation de l'activité de l'AMPK par PPM1A (adapté de *Davies et al. 1995 [126]*)

Deux autres protéines, la CaM Kinase II et la HMGCoA Reductase ont été suggérées comme étant des substrats de PPM1A [135, 136]. Celles-ci se retrouvent respectivement en amont et en aval de l'AMPK.

1.5.7.2. Le contrôle du cycle cellulaire et de l'apoptose

PPM1A semble jouer un rôle important dans la modulation du cycle cellulaire et de l'apoptose. En effet, plusieurs études ont montré que cette phosphatase possède des substrats ou semble jouer un rôle dans les voies de signalisation contrôlant ces mécanismes. Il a d'abord été montré que PPM1A déphosphoryle et ainsi inactive la protéine Cyclin-dépendent kinase 2 (Cdk2) dans des cellules humaines en culture [124]. Cdk2 est une kinase qui en s'associant à la cycline E permet le passage au-delà du point de restriction lors de la transition de la phase G1 vers la phase S du cycle cellulaire. Lorsqu'activée, Cdk2 phosphoryle la protéine Rb, permettant ainsi la réplication de l'ADN [137]. La surexpression de PPM1A dans des cellules en culture inhibe la transition de la phase G2 vers la phase M, la mitose, par un mécanisme qui reste à être démontré [138]. En effet, sans identifier de substrat, l'étude montre par cytométrie l'arrêt en phase G2 du cycle cellulaire des cellules surexprimant de façon ponctuelle PPM1A. Ainsi, PPM1A serait en mesure d'interrompre complètement le cycle cellulaire en stoppant celui-ci lors des deux phases de croissance (figure 1.12).

Les mêmes expériences ont montré que la surexpression de PPM1A en plus d'induire un arrêt du cycle cellulaire, induit aussi l'apoptose. Celle-ci passerait par l'action de la protéine p53, un facteur crucial aux phénomènes de sénescence et d'apoptose. En effet,

lorsqu'on surexprime PPM1A dans des cellules en culture, on induit une augmentation significative de l'expression et de l'activité de p53. Bien que le mécanisme d'action reste inconnu, l'activité catalytique de PPM1A est essentielle à l'observation de ce phénomène, puisque la surexpression d'une phosphatase catalytiquement inactive ne produit pas le même effet. De plus, en réduisant le niveau endogène de p53 avant de surexprimer PPM1A on obtient un plus fort taux de survie cellulaire suggérant donc qu'en fait PPM1A induit l'apoptose en augmentant le niveau d'expression et l'activité de p53 [138].

PPM1A peut aussi moduler la phosphorylation de la protéine BAD, un membre proapoptotique de la famille de Bcl2 qui peut se dimériser avec les protéines de survie Bcl afin de promouvoir l'apoptose. Sa phosphorylation est inactivatrice, donc en la déphosphorylant, PPM1A joue encore une fois un rôle proapoptotique [139, 140].

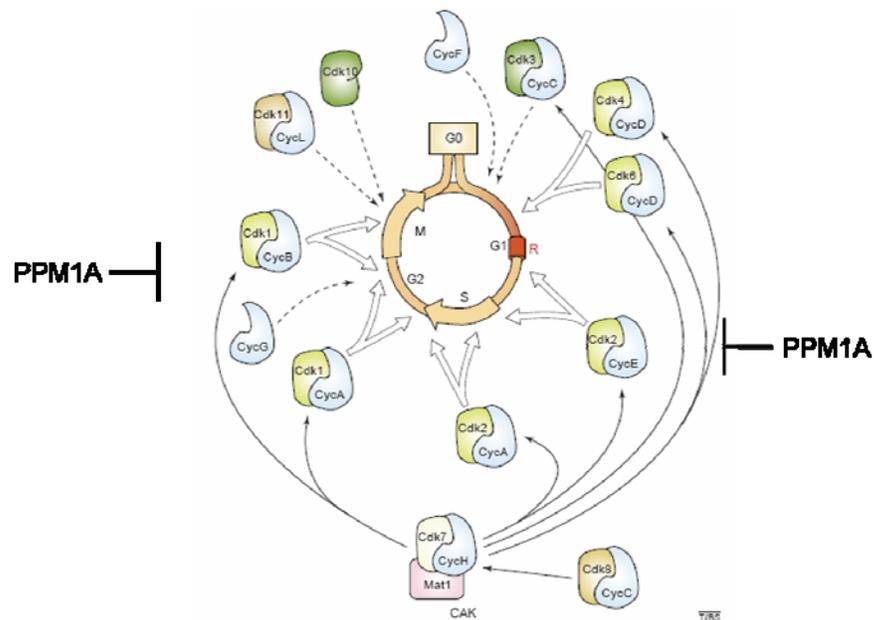


Figure 1.12 Modulation du cycle cellulaire par PPM1A (adapté de Malumbres et al. 2005 [137])

La voie de signalisation par le récepteur du Tumor Growth Factor β (TGF β) est une autre voie importante à la croissance cellulaire. En effet, celui-ci contrôle la prolifération, la différenciation, le remodelage de la matrice extracellulaire et le développement embryonnaire. Son activité passe par l'activation d'une famille particulière de facteurs de transcriptions, les Smads. Lorsque le récepteur TGF β est inactif, les Smads ne sont pas phosphorylés et se localisent au cytoplasme. Une fois activé, le récepteur TGF β induit la phosphorylation des Smads qui forment des complexes avec la protéine Smad4 et sont

importées au noyau où elles joueront le rôle de facteurs de transcription [141]. PPM1A module cette voie en déphosphorylant les protéines Smad2 et Smad3, inhibant ainsi leur import nucléaire et du même coup leur activité transcriptionnelle. En accord avec cela, la réduction du niveau de PPM1A par interférence à l'ARN favorise l'activité transcriptionnelle de Smad2 et de Smad3 et du même coup l'activité globale de la voie de signalisation du récepteur TGF β [142, 143].

1.5.7.3. Modulation des kinases de stress

Une des voies de signalisation qui semble être sous un contrôle important de PPM1A est celle des MAPK, plus spécifiquement la branche des SAPKs qui se divise elle-même en deux voies, celle de la p38 MAPK et celle de JNK. En effet, plusieurs études ont montré que la surexpression de PPM1A diminue l'activation de ces deux voies à plusieurs niveaux et en réponse à différents facteurs. Lorsque des cellules surexprimant PPM1A sont stimulées avec de l'anisomycine ou du sel (qui augmentent l'osmolarité), on retrouve une phosphorylation réduite de p38 ainsi que de MKK3b et MKK6b, des kinases en amont de p38. Aussi, les phosphorylations de JNK et de sa kinase en amont, MKK7, sont diminuées. On aurait ainsi une suppression sélective de la signalisation par les MAPK dans la branche des kinases activées par le stress [144].

D'autres auteurs ont montré que l'expression de PPM1A réduit la signalisation par les SAPK au niveau des protéines directement en aval de p38 et de JNK, les MAP Kinase Kinases *in vitro* et *in vivo*. Dans ce cas-ci, ces protéines sont MKK6 et SEK1 (MKK4). De plus, PPM1A semble agir directement sur p38 puisqu'il immunoprécipite avec celui-ci et son expression réduit sa phosphorylation [145]. La figure 1.13 résume l'action de PPM1A sur les voies des MAPK, plus spécifiquement celles des SAPKs.

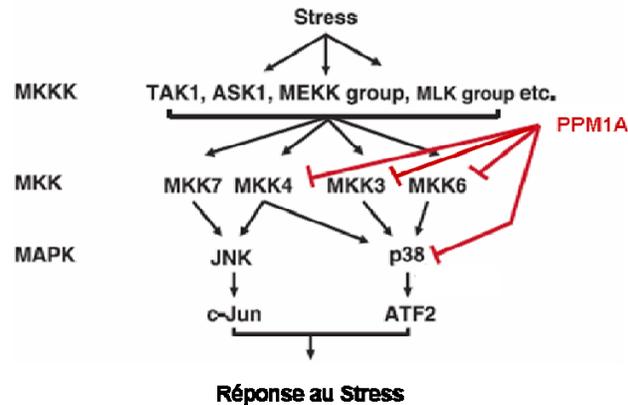


Figure 1.13 Modulation des Kinases Associées au Stress par PPM1A (adapté de Tamura et al. 2006 [146])

1.5.7.4. Effet sur la signalisation du récepteur d'insuline

La signalisation par le récepteur insuline est une autre voie de signalisation importante modulée par PPM1A. Dans un premier temps, il a été constaté que l'expression de PPM1A augmente lors de la différenciation des cellules 3T3-L1 en adipocytes. Cette observation suggère donc que PPM1A pourrait jouer un rôle potentiel lors de la différenciation de ces cellules. De plus, les auteurs de cette étude ont suggéré la sous-unité régulatrice de PI3K comme étant la principale cible de PPM1A. De plus, ils ont observé que la surexpression PPM1A augmente l'absorption de glucose par les cellules 3T3-L1 en activant de façon directe la voie PI3K. Cette activation de la voie PI3K passerait vraisemblablement par l'entremise de la déphosphorylation d'un résidu de la PI3K inhibant son activité. Ces suggestions ont été ensuite renforcées par la démonstration, en utilisant la technique d'immunoprécipitation, que la sous-unité p85 de la PI3K et la phosphatase PPM1A sont capable de s'associer dans les cellules. En somme, une fois activé, la PI3K est responsable de la conversion de PIP₂ en PIP₃, permettant ainsi l'arrivée à la membrane d'Akt qui est ensuite phosphorylée et activée par PDK1. Ceci est suivi par l'activation de la portion en aval de la voie de signalisation, qui est de beaucoup réduite lorsque l'on réduit le niveau cellulaire en PPM1A par interférence à l'ARN [147].

Il a aussi été montré que PPM1A peut interagir avec PTEN, une phosphatase dont le rôle principal est de contrecarrer l'action de la PI3K. Bien que rien n'ait été démontré à ce niveau quant à une modulation possible de son activité par la phosphatase, cette hypothèse n'est pas non plus à exclure [120].

1.5.7.5. Autres substrats de PPM1A

Il existe d'autres substrats de PPM1A qui ne font pas partie des catégories mentionnées ci-haut, mais dont le rôle n'en est non moins important. Ceux-ci suggèrent que le rôle de PPM1A ne se limite pas à la croissance cellulaire, l'apoptose, au métabolisme énergétique et à la réponse à l'insuline.

Par exemple, PPM1A semble jouer un rôle dans le système nerveux et la transmission du signal entre neurones, puisqu'il compte parmi ses substrats un canal de calcium contrôlé par le voltage, mGluR3, un récepteur couplé aux protéines G jouant un rôle dans la plasticité synaptique, et DARPP32, une protéine importante dans la réponse à la dopamine et au glutamate [148-150].

Une autre protéine modulée par PPM1A est l'axine, qui est une protéine d'échafaudage importante dans plusieurs voies de signalisation et un régulateur négatif de la voie de Wnt. Elle joue notamment un rôle important dans la prolifération, la détermination du destin cellulaire et la suppression de tumeur [151, 152].

Enfin, PPM1A joue un rôle dans la migration cellulaire, la Moesine ayant été identifiée comme un de ses substrats [153]. La déphosphorylation de la Moesine empêche l'interaction entre l'actine-F et la moesine ce qui empêche la liaison de la membrane plasmique au cytosquelette impliquée dans la migration cellulaire.

1.6. Hypothèse et Objectifs

Il est maintenant communément admis que l'augmentation du niveau des acides gras libres et des cytokines dans la circulation des sujets ayant une résistance à l'action de l'insuline (c.-à-d. obèses ou diabétiques) est capable de déclencher l'activation des kinases de stress, principalement dans le foie et les muscles squelettiques. L'activation de ces kinases va à son tour augmenter la phosphorylation sur des résidus sérine, des molécules critiques impliquées dans la signalisation insulinique (e.g. IR, IRS et p85). La phosphorylation de ces molécules va ensuite augmenter leurs ubiquitination et leur dégradation et conduit finalement à la diminution de la réponse cellulaire à l'insuline.

Plusieurs kinases activées par le stress cellulaire (JNK, p38 et AMPK) ont été suggérées comme étant des substrats de la protéine sérine/thréonine phosphatase PPM1A. Par conséquent, un rôle physiologique de la protéine phosphatase PPM1A dans la résistance à l'action de l'insuline et dans les processus métaboliques a été précédemment suggéré. Cependant, on trouve peu d'études sur ce sujet. L'absence des inhibiteurs chimiques conjugués à l'absence d'un modèle animal (perte de fonction ou de gain de fonction) sont les raisons principales qui pourraient expliquer la rareté des travaux sur les fonctions physiologiques de la protéine phosphatase PPM1A. Ainsi, et dans le but d'éclairer le rôle physiologique de cette protéine phosphatase dans les processus métaboliques, nous avons émis une hypothèse de travail selon laquelle, en augmentant l'activité PPM1A, nous pourrions être en mesure de réguler à la baisse l'activité des kinases activées par le stress cellulaire et d'améliorer la réponse cellulaire à l'insuline et finalement de corriger les anomalies glucidiques et lipidiques observées dans plusieurs situations pathologiques associées à la résistance à l'action de l'insuline. Subséquemment, nous avons décidé de générer un modèle animal qui exprime le gène humain PPM1A dans le foie. Nous avons choisi le foie comme organe cible puisqu'il joue un rôle capital dans l'homéostasie de glucose et des lipides. De plus, le foie est grandement impliqué dans les processus de développement de la résistance à l'insuline et des maladies métaboliques qui y sont associées, telles que le diabète et les anomalies lipidiques.

2. MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1. Anticorps et Réactifs

2.1.1. Anticorps

L'anticorps monoclonal dirigé contre PPM1A provient d'Abcam (Cambridge, MA). L'anticorps monoclonal anti-GAPDH provient d'Ambion (Distribué par Applied Biosystems Canada, Streetsville, ON). L'anticorps monoclonal anti- β -actine provient de Sigma-Aldrich (St-Louis, MA). Les anticorps polyclonaux anti-Phoso-JNK et anti-GST proviennent de Cell Signaling Technologies (Distribué par New England Biolabs LTD., Mississauga, ON), l'anticorps anti-Myc a été purifié précédemment en laboratoire.

Les anticorps secondaires sont produits dans la chèvre et ils reconnaissent les immunoglobulines de types G (IgG) de souris ou de lapin. Ces anticorps sont couplés à l'enzyme Horse Radish Peroxydase (HRP) et ils proviennent de chez Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc. (West Grove, PA).

2.1.2. Réactifs utilisés sur les souris

L'insuline injectée aux souris provient de chez Eli Lilly (Toronto, ON). Le réactif de dosage des triglycérides et le standard ont été obtenus de Roche (Mannheim, Allemagne).

2.2. Plasmides de surexpression de gène humain PPM1A

2.2.1. Plasmides de surexpression de gène hPPM1A dans les cellules HepG2

Afin de générer un plasmide mammalien (pME-PPM1A-Myc/His WT) nécessaire pour la surexpression du gène humain PPM1A dans les cellules HepG2, nous avons procédé à l'amplification de ce gène à partir des ARN totaux provenant des cellules HepG2. Ensuite, l'ADN complémentaire a été purifié et inséré dans le plasmide pME1 en amont de séquence codant pour deux épitopes Myc, de six acides aminés histidines et un codon stop qui est localisé juste après le sixième acide aminé histidine. Ensuite, une mutagenèse dirigée sur ce plasmide nous a permis d'obtenir un plasmide qui code pour une protéine PPM1A-Myc/His catalytiquement déficient (pME-PPM1A-Myc/His RG). Dans ce mutant inactif de PPM1A,

la séquence nucléotidique codant pour l'acide aminé arginine en position 174 a été remplacée par une séquence nucléotidique codant pour l'acide aminé glycine. La mutagenèse dirigée a été effectuée selon la méthode quickchange de stratagène.

2.2.2. Construction du vecteur de transgénèse

L'exon-intron de la β -globine ainsi que le polyA sont extraits d'un vecteur que nous possédions déjà par digestion avec les enzymes de restriction HindIII et BamHI. En parallèle, le plasmide pSP72 a été clivé par les mêmes enzymes, puis le vecteur linéarisé et le fragment obtenu sont ligués ensemble donnant le vecteur que nous nommons pSP72-ExPoly.

Par la suite, le vecteur pSP72-ExPoly et le plasmide pME-PPM1A-Myc/His-WT (qui contient une séquence nucléotidique qui code pour une protéine chimérique hPPM1A et deux épitopes et six histidines sur sa partie C-terminale) sont clivés avec les enzymes de restriction BamHI et ClaI. Le fragment obtenu et le vecteur linéarisé sont ensuite ligués ensemble donnant le vecteur pSP72-hPPM1A-ExPoly. Enfin, le promoteur minimal du gène transthyrétine (TTR) a été obtenu du laboratoire du Dr Idriss Djilali-Saiah (Centre de recherche de l'hôpital Sainte-Justine). Ce promoteur fut ensuite amplifié par PCR et inséré en amont de l'ADNc du gène hPPM1A dans le plasmide pSP72-hPPM1A-ExPoly afin d'obtenir notre vecteur transgénique final (pSP72-TTR-hPPM1A-ExPoly).

2.3. Validation du vecteur de transgénèse

2.3.1. Séquençage des plasmides d'expression et du vecteur transgénique

Une série de séquençages, effectuée à l'IRIC de l'Université de Montréal, nous a révélé la présence de tous les éléments nécessaires (promoteur, fragment codant pour le gène hPPM1A, tag-Myc/His, codon stop, intron/exon et queue de polyadénine). De plus, ce séquençage n'a pas révélé la moindre erreur ou d'autres anomalies dans l'ensemble des plasmides d'expression et de la cassette de transgène.

2.3.2. Expression de vecteur de transgène dans les hépatocytes HepG2

Les cellules HepG2 ont été maintenues dans un milieu de culture DMEM auquel nous avons ajouté 10% de FBS, 1mM de pyruvate de sodium et 1x des acides aminés non essentiels. Les cellules ont été cultivées à 37°C avec 5% CO₂. Les transfections transitoires des cellules HepG2 ont été effectuées dans des pétris de 10cm de diamètre. Pour ce faire, les cellules ont été passées à 50% de confluence la veille. Le lendemain dans la matinée, les cellules ont été transfectées en utilisant le Fugene 6 (Roche) selon les recommandations du fabricant. Une quantité totale de cinq microgrammes d'ADN par pétri a été utilisée pour la transfection. À la fin de la journée, le milieu de culture a été changé pour un milieu frais. Deux jours post-transfection, les cellules ont été soit lysées ou privées en sérum en préparation d'une stimulation avec le TNF α . Pour la privation, les cellules ont été rincées avec un volume de PBS puis un demi-volume de milieu contenant 0.1% BSA a été ajouté. La stimulation par 10ng/ml de TNF α pendant 10 minutes a été déclenchée par l'ajout direct du volume approprié de TNF α dans le milieu de culture puis les pétris sont retournés dans l'incubateur à 37°C avec 5% CO₂. À la fin de la période de stimulation, le milieu de culture a été aspiré, les cellules rincées avec du PBS puis celles-ci ont été lysées dans les pétris placés sur glace.

2.4. Génotypage des souris hPPM1A-Myc/His

2.4.1. Extraction de l'ADN génomique des queues de souris

Des morceaux de queues (environ 0,5cm) sont prélevés sur les souris à génotyper. Ils sont incubés dans 500 μ L de tampon de lyse (100mM Tris-HCl pH8, 0, 200mM NaCl, 5mM EDTA, 0,2% SDS, en solution dans l'eau) additionnée de 0.4mg de protéinase K durant la nuit à 55°C. L'ADN est obtenu le lendemain en le précipitant à l'isopropanol/éthanol puis en le dissolvant dans de l'eau à 55°C (environ 200 à 300 μ L) durant 20 minutes de façon à obtenir une concentration d'environ 1 μ g/ μ L.

2.4.2. Amplification du transgène

L'ADN de queue de souris est amplifié par PCR selon le programme suivant : une étape initiale de deux minutes à 95°C, puis 35 cycles comportant une étape de dénaturation de 30 secondes à 95°C, une étape d'hybridation de 30 secondes à 57°C et une étape d'élongation de 30 secondes à 68°C. Le tout se termine par 10 minutes à 68°C.

2.4.3. Migration sur gel d'agarose

Pour fin d'analyses, l'ADN est séparé sur un gel d'agarose 2% sous une tension de 80V.

2.5. Analyses de phénotype des souris transgéniques

2.5.1. Prélèvement de sang et des foies

Avant de prélever leur foie, les souris sont anesthésiées par le gaz isoflurane puis environ 1ml de sang a été retiré par ponction cardiaque. Ces souris sont ensuite disséquées et leur foie est récupéré puis congelé dans l'azote liquide. Les foies sont ensuite emballés dans une feuille de papier d'aluminium correctement identifiée puis entreposés à -80°C.

2.5.2. Dosage des protéines et préparation des extraits de foie

Les extraits de foie sont préparés en homogénéisant un 1mg de foie dans du tampon de lyse (150mM NaCl, 50mM Tris-HCL pH 7,4, 0,25% NaDeoxycholate, 1mM EDTA, 1mM EGTA, 50mM NaF, 1% NP40, 5µg/ml Aprotinin, 5µg/ml Leupeptin, 1mM PMSF, 0,2 mM Sodium Orthovanadate) et en l'incubant, sur la glace, pendant dix minutes. Les homogénats sont ensuite centrifugés à 17530 g durant dix minutes à 4°C puis le surnageant est récupéré dans un nouveau tube. Par la suite, la teneur en protéine est mesurée en suivant la méthode de Bradford à l'aide du kit de dosage de protéines Bio-Rad.

2.6. Immunobuvardage de Type Western

2.6.1. Séparation des protéines sur un gel de polyacrylamide

Les protéines sont séparées sur un gel de SDS et polyacrylamide (SDS-PAGE) par électrophorèse sous une tension de 160V.

2.6.2. Transfert des protéines sur une membrane de PVDF

Le transfert s'effectue sur une membrane de PVDF immobilon-P ayant des pores de 0,45µm. La membrane est préparée au transfert selon les instructions du fabricant. Le transfert est effectué à 4°C durant 70 minutes sous une tension de 100V et un courant de 2A.

2.6.3. Immunobuvardage de Type Western des protéines

La membrane est bloquée avec 1% de lait écrémé ou de BSA, puis incubée durant la nuit avec l'anticorps primaire à 4°C. Elle est ensuite lavée au PBS-T 1X (1,47mM NaH₂PO₄, 8,09mM Na₂HPO₄, 19,6mM NaCl et 0,5% Tween-20) puis incubée 1 heure avec l'anticorps secondaire puis lavée une seconde fois au PBS-T.

2.6.4. Révélation des membranes

Une fois les derniers lavages terminés, la membrane est égouttée puis incubée durant une minute dans le mélange de révélation ECL (composé de Luminol augmenté et d'agent oxydant dans une ration de 1 : 1). Elle est ensuite égouttée encore une fois puis placée dans une cassette d'autoradiographie. Un film autoradiographique KODAK X-OMAT LS est ensuite exposé à la membrane pour une durée de temps variant (généralement de 30 secondes à cinq minutes) selon l'anticorps primaire utilisé et la quantité de protéines dans le gel. Le film est ensuite développé à l'aide d'un développeur automatique de marque Hope MicroMax.

2.6.5. Décapage des anticorps

Afin de pouvoir effectuer des immunobuvardage subséquents sur les mêmes membranes, les anticorps primaires et secondaires sont décapés après la révélation précédente puis les membranes sont lavées et réutilisées. Le retrait complet des anticorps de la membrane est réalisé en incubant celle-ci dans la solution de décapage (62,5 mM Tris-HCl pH 6,8, 2% SDS et 100mM β -mercaptoéthanol) durant 30 minutes à 50°C. La membrane est ensuite lavée quatre fois avec de l'eau ultrapure durant cinq minutes et une fois avec du PBS-T. Elle est alors prête pour un nouveau immunobuvardage de type Western subséquent.

2.7. Suivi de la croissance pondérale des souris

À partir de leur septième semaine de vie jusqu'au leur treizième semaine, les souris sont pesées une fois par semaine (dans la matinée vers 11h00). Les valeurs sont ensuite compilées, la moyenne, l'écart type et le SEM calculés à partir de celles-ci. Puis elles sont portées sur un graphique mesurant le gain de poids moyen à partir de la septième semaine.

2.8. Extraction et dosage du glycogène hépatique

Le dosage du glycogène est effectué selon la méthode de Kemp [154]. Brièvement, 20 à 25mg d'échantillons de foie de souris sont prélevés et homogénéisés dans 5ml de méthanol à 80% à l'aide d'un polytron. L'homogénat est ensuite centrifugé à 650 g durant cinq minutes et le surnageant est jeté. Le culot est suspendu à nouveau dans 5ml de solution de déprotéinisation (5% Acide Trichloroacétique, 0,1% Ag_2SO_4) et chauffé à 100°C durant 15 minutes. La solution est ensuite refroidie à l'eau courante et centrifugée à 650 g durant cinq minutes. Le surnageant, qui contient le glycogène hépatique, est ensuite récupéré.

Le dosage du glycogène est ensuite effectué de la façon suivante : 250 μL de surnageant ou de solution standard de glucose est mélangée à 750 μL d' H_2SO_4 36N et le mélange est chauffé à 100°C durant six minutes pour ensuite être refroidi à l'eau courante. La densité optique à 520 nm est ensuite mesurée et la concentration de glycogène en micromole par gramme de foie est calculée à l'aide de l'échelle de glucose.

2.9. Extraction et dosage des triglycérides hépatiques

Afin de doser la concentration des triglycérides dans le foie des souris, 0,1 g de foie par souris est prélevé et homogénéisé au polytron dans 1ml d'une solution saline. Par la suite, 500 μ L d'homogénat est dilué dans 10ml de tampon d'extraction de Folch (deux équivalents de chloroforme et un équivalent de méthanol) et les lipides sont extraits durant la nuit entière avec agitation sur une râtisserie. Le lendemain, 2ml d'une solution saline est ajouté et mélangé dans chacun des tubes et ceux-ci sont centrifugés à température pièce durant 15 minutes à 454 g. Le surnageant est jeté et la phase intérieure est complètement évaporée sous azote. Les résidus restants sont suspendus à nouveau dans 500 μ L de tampon Folch. Un aliquot de 100 μ L est par la suite prélevé et additionnée d'une solution contenant 20% Thésit (Fluka) dans du chloroforme. Le tout est évaporé sous azote et suspendu à nouveau dans 800 μ L d'eau. Les tubes sont enfin incubés, avec agitation, à la température ambiante pendant une heure puis pendant 15 minutes à 37°C. Les lipides sont par la suite dosés à l'aide du kit de dosage des triglycérides de Roche selon les instructions du fabricant. Les résultats obtenus sont par la suite exprimés sous forme de milligramme de triglycérides par gramme de foie.

2.10. Mesure de la glycémie plasmatique

La glycémie des souris est mesurée à l'aide d'un glucomètre One Touch Ultra (LifeScan, É.-U.). Les souris privées de nourriture ou non sont immobilisées dans un tube en plastique troué afin de leur permettre de respirer, de façon à ce que leurs pattes arrières et leur queue soient à l'extérieur du tube. Une des pattes arrières est rasée et enduite de vaseline afin de localiser la veine saphène de la souris, puis celle-ci est perforée avec la pointe d'une aiguille. Une bandelette est insérée dans le glucomètre en suivant les instructions du manufacturier, puis cette bandelette est mise en contact avec la goutte de sang issue de la perforation lorsque celle-ci atteint une taille suffisante. La glycémie sanguine est ensuite lue sur l'appareil.

2.11. Test de tolérance au glucose

La tolérance au glucose des souris est mesurée en les gavant avec une solution riche en glucose. Les souris sont privées de nourriture durant toute la nuit. Ensuite, ces souris sont pesées et leur glycémie à jeun est mesurée en coupant un bout de leur queue et en massant doucement afin de générer une goutte de sang suffisante. Les souris sont ensuite gavées avec une solution d'eau et de sucre de façon à ce qu'elles ingèrent deux grammes de sucre par kilogramme de masse. Leur glycémie est ensuite mesurée 30, 60 et 120 minutes après le gavage initial et les résultats portés sur une courbe exprimant la variation de la glycémie des souris transgéniques et de type sauvage en fonction du temps écoulé après le gavage.

2.12. Test de tolérance à l'insuline

Les souris sont privées de nourriture durant six heures. Ensuite, elles sont pesées et leur glycémie à temps zéro est mesurée. Puis, ces souris sont injectées avec 1U d'insuline par kilogramme de masse dans la cavité intrapéritonéale. La glycémie est ensuite mesurée à 30, 60 et 120 minutes après l'injection d'insuline. Les résultats sont portés sur un graphique exprimant la variation de glycémie en fonction du temps suivant l'injection d'insuline pour les deux groupes de souris.

2.13 Analyse statistiques

La significativité des résultats quantitatifs est évaluée à l'aide d'un test t de student.

3. RÉSULTATS

3.1. Génération de vecteur de transgène

Bien qu'un rôle de la protéine phosphatase PPM1A dans les processus métaboliques ait été précédemment suggéré, on trouve peu d'études sur ce sujet. Subséquemment et afin d'établir le rôle de cette protéine phosphatase dans les processus métaboliques, nous avons décidé de générer des souris transgéniques surexprimant le gène humain PPM1A (hPPM1A) dans leur foie, un des principaux organes contrôlant la glycémie, la synthèse et la sécrétion des lipoprotéines. Ces souris transgéniques vont donc nous permettre d'étudier le rôle de PPM1A à l'échelle d'un organisme entier et d'explorer son implication dans le développement de la résistance à l'insuline et des anomalies lipidiques associées à cette situation pathologique.

Dans ce contexte, nous avons construit un vecteur de transgénèse contenant l'ADN complémentaire codant pour le gène humain PPM1A sous le contrôle du promoteur de la transthyréine (TTR). La figure 3.1 représente la carte du vecteur final utilisé pour la transgénèse. Dans ce vecteur, l'ADNc du gène hPPM1A a été cloné dans le plasmide pSP72. Préalablement, l'ADNc a été amplifié par RT-PCR à partir des ARN totaux extraits des cellules HepG2 (cellules d'hépatoblastome humain). Afin de faciliter l'isolation et la détection de la protéine transgénique, nous avons fusionné à la partie 3' de l'ADNc du gène hPPM1A à des séquences nucléotidiques qui code pour deux épitopes Myc et six acides aminés histidines. De plus, nous avons généré un codon stop après le sixième acide aminé histidine. En aval de ce codon stop nous avons inséré un couple intron/exon suivi d'une queue de polyadénine provenant du gène humain β -globine. Le principal rôle de ce couple intron/exon et de la queue polyadénine est de permettre la génération d'un transcrit primaire qui sera finalement traité de façon normale par la cellule.

Enfin, le promoteur minimal du gène transthyréine (TTR) a été obtenu du laboratoire du Dr Idriss Djilali-Saïah (Centre de recherche de l'hôpital Sainte-Justine). Ce promoteur fût ensuite amplifié par PCR et inséré en amont de l'ADNc du gène hPPM1A. Nous avons choisi d'utiliser ce promoteur, puisqu'il induit l'expression de la protéine transthyréine d'une façon constitutive et quasiment exclusive aux hépatocytes. Il est à noter que la transthyréine était précédemment appelée : la préalbumine. En effet, l'ancien nom de la transthyréine provient du fait que cette protéine se déplace plus vite que l'albumine lors d'une électrophorèse. Donc l'utilisation du promoteur TTR dans le contrôle de notre

transgène pourrait nous garantir une expression constitutive et localisée aux hépatocytes des souris transgéniques.

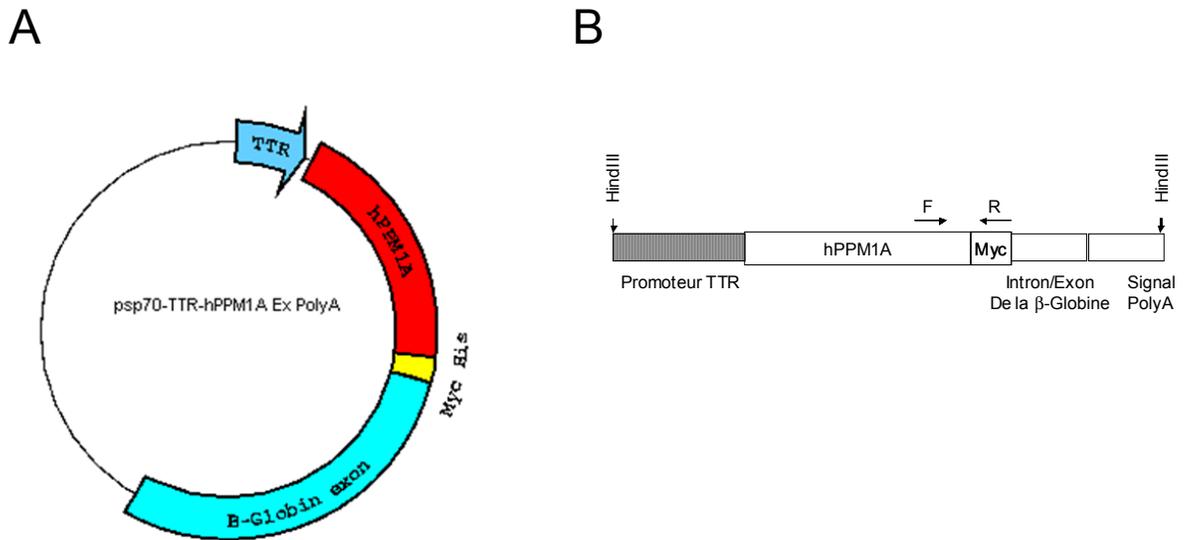


Figure 3.1 Vecteur transgénique

Présentation schématique du vecteur transgénique final (A) et de la cassette transgénique utilisée pour la génération des souris hPPM1A-Myc/His transgéniques (B). Les flèches F et R, dans la partie B de figure, indiquent l'emplacement des sondes utilisées lors du génotypage des souris transgéniques par PCR.

3.2. Validation du vecteur de transgène

Étant donné que la génération des animaux transgéniques est un processus long et coûteux, il était nécessaire de valider notre vecteur de transgène et de s'assurer qu'il était fonctionnel. À cette fin, un séquençage complet de la cassette de transgène (promoteur, fragment codant pour le gène hPPM1A, tag-Myc/His, codon stop, intron/exon et queue de polyadénine) a été préalablement effectué. Ce séquençage n'a pas révélé la moindre erreur ou anomalie dans l'ensemble de la cassette de transgène.

La génération des souris transgéniques nécessite également la séparation de la cassette de transgène du reste du vecteur et ensuite la purification de ce fragment d'ADN. Ainsi et dans le but de séparer la cassette de transgène du reste du vecteur, nous avons introduit deux sites de restriction HindIII dans le vecteur de transgène, un site à chaque extrémité de la

cassette de transgène. La figure 3.2A démontre que la digestion de notre vecteur transgénique final par l'enzyme de restriction HindIII libère la cassette transgénique. En effet, l'analyse par électrophorèse sur gel d'agarose des produits de digestion par l'enzyme HindIII démontre que la cassette transgénique est facilement séparable du reste du vecteur (Fig. 3.2A colonne 1, bande du bas). De plus, il est facile de récupérer la cassette transgénique sans la contaminer avec l'ADN du reste du vecteur (Fig. 3.2A colonne 2).

Par la suite, la fonctionnalité du promoteur fût évaluée en transfectant le vecteur de transgénèse (pSP72-TTR-hPPM1A-ExPoly sur la figure 3.2B) ou une copie de ce vecteur ne contenant pas de promoteur (pSP72-hPPM1A-ExPoly sur la figure 3.2B) dans des cellules hépatiques de lignée HepG2. Deux immunobuvardages de type western ont été successivement effectués sur des extraits de ces cellules. Dans le premier immunobuvardage de type western, nous avons utilisé un anticorps contre l'épitope Myc afin de révéler l'expression de la protéine PPM1A-Myc/His exogène, alors que le deuxième immunobuvardage de type western a été effectué en utilisant un anticorps contre la protéine PPM1A. Cet anticorps devrait donc révéler simultanément la présence de la protéine PPM1A endogène et la protéine PPM1A-Myc/His exogène. Il faut noter que la présence des tag-Myc/His sur la partie C-terminale de la protéine chimérique devrait augmenter le poids moléculaire de cette protéine d'environ 5 kDa.

La figure 3.2B montre que lorsque le promoteur TTR est bien présent, que les cellules HepG2 expriment bien le transgène (une seule bande, lors de l'immunobuvardage anti-Myc et la bande du haut lorsqu'on utilise l'anticorps anti-PPM1A). Par contre, lorsque le promoteur TTR est absent la protéine chimérique n'est pas exprimée. De plus, il est évident de constater que, dans les hépatocytes HepG2, bien que le niveau d'expression de la protéine chimérique est deux à trois fois plus fort que le niveau d'expression de la protéine PPM1A endogène, cela n'affecte pas le niveau d'expression de la protéine endogène (bande du bas dans l'immunobuvardage anti-PPM1A).

Dans notre stratégie pour générer des souris transgéniques surexprimant le gène hPPM1A dans leurs hépatocytes, nous avons décidé d'ajouter à l'extrémité C-terminale de la protéine transgénique des épitopes Myc/His afin de faciliter l'isolation et l'identification de cette protéine de fusion.

Donc, il était primordial, avant de générer les souris transgéniques, de s'assurer que l'ajout de ces épitopes sur la partie C-terminale de la protéine chimérique hPPM1A-Myc/His ne modifie pas son activité phosphatasique. Ainsi, des constructions similaires à celle utilisée

pour la transgénèse ont été cotransfectées avec la protéine JNK, un substrat potentiel de la phosphatase PPM1A, dans des hépatocytes HepG2.

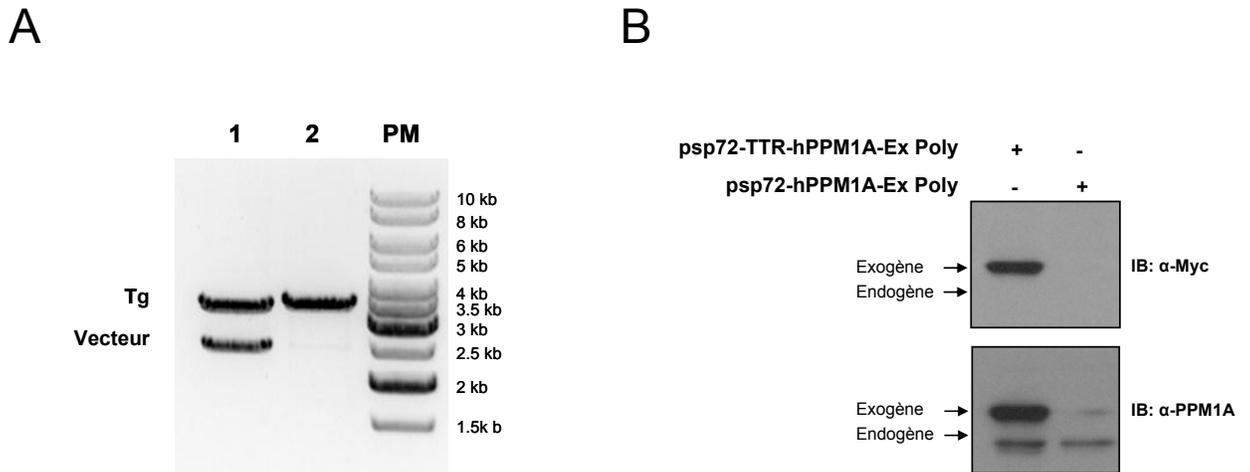


Figure 3.2 Validation du vecteur de transgénèse.

A. La migration de produits de digestion du vecteur de transgénèse final (puits 1) comparé à la migration de la cassette de transgénèse purifiée sur une colonne d'affinité (puits 2). Ces fragments d'ADN ont été séparés par électrophorèse sur gel d'agarose 1%.

B. Le vecteur de transgénèse final (pSP72-TTR-hPPM1A-ExPoly), ou une copie de ce vecteur ne contenant pas de promoteur (pSP72-hPPM1A-ExPoly) ont été utilisés pour transfecter des cellules HepG2. Quarante-huit heures après la transfection, ces cellules ont été lysées et 50 μ g des lysats cellulaires totaux ont été analysés par électrophorèse SDS-PAGE suivie d'un immunobuvardage de type western avec des anticorps contre l'épitope Myc puis contre la protéine PPM1A.

Quarante-huit heures après la transfection, ces cellules ont été stimulées avec 0 ou 10 ng/ml de TNF α pendant 10 minutes afin de stimuler JNK et d'augmenter le niveau de sa phosphorylation. Des extraits cellulaires totaux (50 μ g) ont été ensuite analysés par électrophorèse SDS-PAGE suivie d'un immunobuvardage de type western avec des anticorps contre phospho-JNK et GST (puisque la protéine JNK est fusionnée au GST). Le panneau du haut de la figure 3.3 montre l'immunobuvardage phospho-JNK. On observe en premier lieu qu'en absence de TNF α JNK n'est pas phosphorylée, alors que c'est le contraire lorsque les cellules sont mises en présence de cette cytokine. En second lieu, lorsque les cellules expriment un PPM1A-Myc/His fonctionnel (hPPM1A wt), la phosphorylation de JNK est complètement contrecarrée malgré la présence des épitopes Myc/His sur sa partie C-terminale. Par contre, lorsqu'on exprime une protéine PPM1A-Myc/His catalytiquement inactive (hPPM1A RG, dont l'acide aminé arginine en position

174 a été remplacé par un acide aminé glycine), cet effet n'est pas observé. Ainsi, l'ajout des épitopes Myc/His à la partie C-terminale de PPM1A ne semble pas avoir d'effets néfastes sur l'activité catalytique de la protéine chimérique PPM1A-Myc/His.

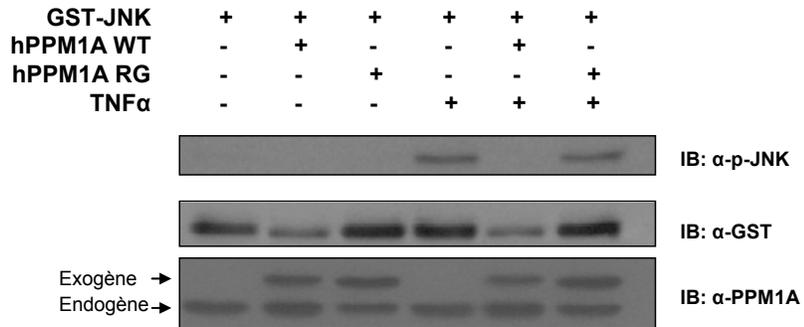


Figure 3.3 Activité phosphatase de PPM1A

L'ajout des épitopes Myc/His sur la partie C-terminale de la protéine hPPM1A ne modifie pas l'activité phosphatase de cette protéine. PPM1A-Myc/His de type sauvage (hPPM1A wt) ou un mutant inactif de cette protéine (hPPM1A RG, dont l'acide aminé arginine en position 174 a été remplacé par un acide aminé glycine) ont été cotransfectés avec la protéine JNK (fusionnée à un GST) dans des cellules HepG2. Quarante-huit heures après la transfection, ces cellules ont été stimulées avec du TNF α (0 ou 10ng/ml, pendant 10 min). Ensuite, 50 μ g des lysats cellulaires totaux ont été analysés par électrophorèse SDS-PAGE suivie d'un immunobuvardage de type western avec des anticorps contre la forme phosphorylée de JNK, contre le GST et contre PPM1A.

Pris ensemble, ces résultats montrent que le vecteur de transgénèse n'a pas de mutations qui pourraient altérer son expression. De plus, la cassette de transgène est facilement séparable du reste du vecteur et la purification de cette cassette sur une colonne d'affinité libre un fragment d'ADN très pur. Le promoteur TTR que nous avons choisi est fonctionnel dans les hépatocytes HepG2 et finalement la protéine chimérique PPM1A-Myc/His y était fonctionnelle malgré l'ajout d'épitopes Myc/His sur sa partie C-terminale.

3.3. Identification des souris transgéniques

Le vecteur étant validé, une grande quantité (environ 250 μ g) de ce vecteur a été digérée par l'enzyme de restriction HindIII. Le produit de digestion a été séparé par électrophorèse sur gel d'agarose 1%. Ensuite, nous avons excisé la pièce de gel qui contient la cassette de

transgène. L'ADN contenu dans cette pièce de gel fût finalement purifié sur une colonne d'affinité et la pureté de l'ADN a été finalement vérifiée par électrophorèse sur gel d'agarose 1% (Fig. 3.2A colonne 2).

L'ADN correspondant à la cassette de transgène purifié fût ainsi utilisé pour la micro-injection dans 623 ovocytes de souris C57BL6/J afin de générer les souris hPPM1A-Myc/His sur un fond génétique C57BL6/J. Ensuite, 369 ovocytes furent implantés dans cinq souris femelles pseudogestantes qui ont finalement donné naissance à 43 nouveau-nés. Les souris générées de cette façon furent finalement génotypées par PCR en utilisant des amorces qui amplifient spécifiquement le transgène (l'emplacement des amorces est indiqué sur la figure 3.1B). Les résultats de PCR ont démontré que cinq des nouveau-nés étaient positifs. Enfin, les souris transgéniques ainsi générées ont été par la suite croisées avec des souris de type sauvage C57BL6/J afin d'obtenir la première génération de souris hémizygotés hPPM1A-Myc/His.

La figure 3.4.A montre le génotypage de souris de la première génération. Après avoir extrait l'ADN génomique des queues des souris, celui-ci était amplifié par PCR avec des amorces ciblant le transgène. Les produits PCR étaient ensuite amenés à migrer sur gel d'agarose en présence de bromure d'éthidium et révéler sous rayons ultraviolets. Sur le gel d'agarose, les produits de PCR pour l'ADN génomique des queues de 5 souris ont été chargés et amenés à migrer, la réaction de PCR devant générer une bande aux alentours de 400 paires de bases. Sur la figure 3.4.A, il est possible d'observer que trois souris sur cinq dans ce cas possédaient bel et bien le transgène.

Bien que la présence de la bande désirée lors du génotypage par PCR confirme l'intégration de la cassette de transgène dans le génome des souris, cela ne peut pas nous garantir une expression adéquate de la protéine transgénique chez ces souris. C'est pourquoi il était impératif de vérifier la présence de la protéine d'une façon ou d'une autre. Donc, deux souris PPM1A génotypées positives et deux souris génotypées négatives furent sacrifiées, et leur foie extrait par la suite. Des lysats cellulaires totaux de ces foies ont été amenés à migrer par électrophorèse sur gel SDS-PAGE puis immunobuvarés contre l'épitope Myc et contre la protéine PPM1A. Comme le montre la figure 3.4.B dans le panneau supérieur, deux (colonnes 2 et 4) des quatre souris choisies surexpriment la protéine hPPM1A-Myc/His dans leurs foies (IB : anti-Myc). De plus, il est intéressant de constater que le niveau d'expression de hPPM1A-Myc/His transgénique (bande du haut dans la Fig. 3.4, IB : anti-PPM1A) correspond à environ cinq fois plus le niveau d'expression de PPM1A

endogène (bande du bas dans la Fig. 3.4B, IB : anti-PPM1A). Enfin, le niveau d'expression de PPM1A endogène ne semble pas affecté malgré l'expression massive (au moins cinq fois plus) de notre protéine transgénique.

Pris ensemble, ces résultats montrent que nous avons bien obtenu des souris transgéniques surexprimant PPM1A dans le foie comme le démontre le génotypage sur gel d'agarose et l'immunobuvardage contre PPM1A. De plus, nous avons constaté une surexpression du transgène correspondant à au moins cinq fois l'expression de la protéine endogène, un seuil intéressant lors de l'étude de phénotype des souris transgéniques.

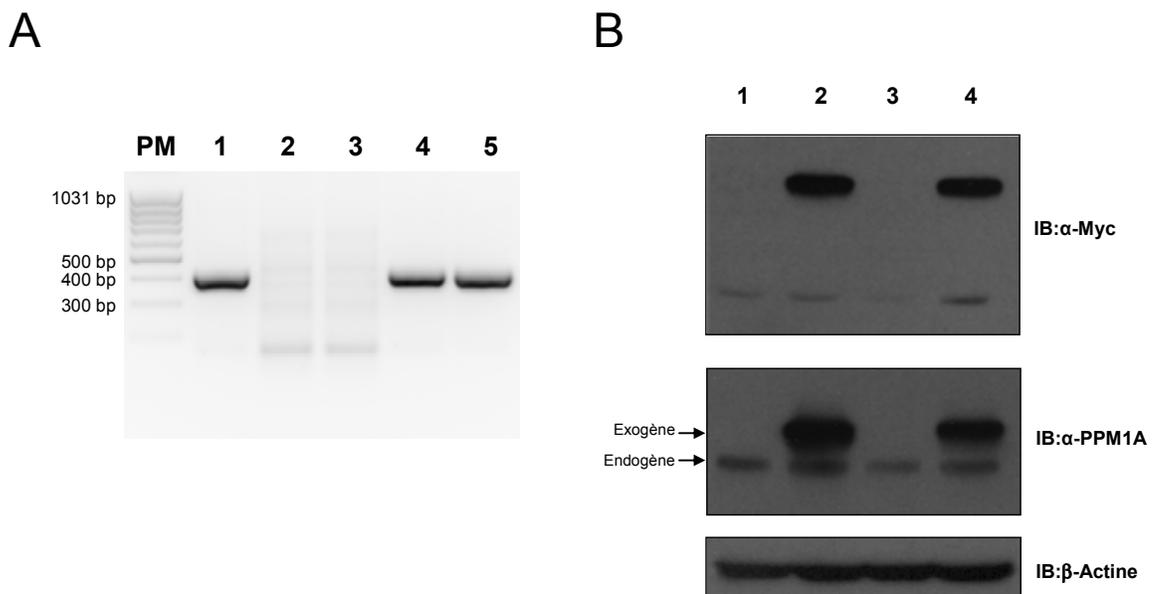


Figure 3.4. Identification des souris transgéniques

A. L'ADN génomique de la queue des souris obtenues après la transgénèse a été extrait puis le transgène fût amplifié par PCR en utilisant des amorces qui amplifient environ 400 paires de bases de fragment transgénique. Les produits PCR ont été ensuite analysés par électrophorèse sur gel d'agarose 1.5% puis révélés à l'aide d'un transilluminateur ultraviolet. B. Les foies de quatre souris (deux transgéniques et deux de type sauvage) ont été prélevés et lysés. Ensuite, 50µg des lysats cellulaires totaux ont été analysés par électrophorèse SDS-PAGE suivi d'un immunobuvardage de type western avec des anticorps contre l'épitope Myc, contre la protéine PPM1A et contre la β-Actine.

3.4. Expression spécifique au foie de transgène

Nous avons choisi d'utiliser le promoteur minimal du gène transthyrétine puisqu'il induit l'expression de cette protéine d'une façon constitutive et quasiment exclusive aux hépatocytes. Donc, nous espérons que cela va nous permettre d'obtenir des souris transgéniques qui expriment la protéine chimérique hPPM1A-Myc/His d'une façon constitutive et strictement localisée dans les hépatocytes. Ainsi et dans le but de vérifier le site d'expression de notre transgène, les organes principaux d'une souris génotypée transgénique furent prélevés et des lysats cellulaires totaux étaient générés à partir de ceux-ci. Par la suite, ces lysats furent amenés à migrer sur gel d'électrophorèse SDS-PAGE et immunobuvarés avec des anticorps anti-PPM1A (figure 3.5 premier panneau) afin de montrer la présence ou non du PPM1A exogène et de comparer le niveau d'expression de la protéine chimérique hPPM1A-Myc/His à celui de PPM1A endogène. La figure 3.5 montre que la protéine transgénique hPPM1A-Myc/His n'est surexprimée que par le foie, comme en témoigne la bande unique dans le puit du foie lors de l'immunobuvarage anti PPM1A (panneau du haut). On constate aussi que l'expression de la protéine endogène qui correspond à la bande du bas dans l'immunobuvarage anti PPM1A est de façon générale ubiquitaire quoique se retrouvant probablement en très petite quantité dans certains organes, en particulier dans le cœur et les muscles. Cette figure permet aussi de constater que le niveau d'expression de la protéine exogène hépatique est d'au moins cinq fois plus grande que le niveau d'expression de PPM1A endogène. Enfin, la présence d'une quantité significative de GAPDH dans chacun des puits (panneau inférieur de la figure 3.5) montre que nous avons chargé tous les puits avec une quantité quasiment comparable de lysat cellulaires.

Pris ensemble, ces résultats montrent que l'expression de PPM1A endogène est ubiquitaire, avec une expression non négligeable au niveau hépatique, et que le transgène s'exprime uniquement dans le foie, tel que désiré.

3.5 Croissance pondérale des souris transgénique

Ayant maintenant en main des souris surexprimant la protéine hPPM1A-Myc/His dans leur foie, nous avons cherché à déterminer quel(s) phénotype(s) nous avons ainsi induit. Dans ce contexte, nous avons commencé par suivre la croissance pondérale des souris transgéniques

comparativement aux souris de type sauvage. Dix souris mâles (quatre de type sauvage et six transgéniques) et seize souris femelles (dix de type sauvage et six transgéniques) ont été pesées une fois par semaine durant sept semaines.

La figure 3.6A représente la courbe de croissance pondérale des souris transgéniques et de type sauvage femelles exprimée en variation de poids moyen à partir de la septième semaine, en fonction du temps.

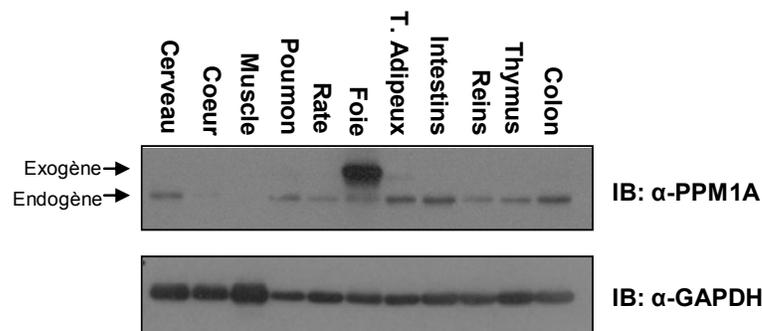


Figure 3.5 Expression hépatique spécifique du transgène

Une souris génotypé positive pour la présence du transgène a été sacrifiée puis ses principaux organes prélevés. Des homogénats furent générés à partir de ceux-ci et analysés par électrophorèse SDS-PAGE suivie d'un immunobuvardage de type western avec des anticorps contre PPM1A et GAPDH.

Dans les premières semaines (sept à neuf), nous n'avons pas observé de différence entre les souris de type sauvage (ligne bleue) et les souris transgéniques (ligne rose). Une différence commence à apparaître à partir de la dixième semaine et elle se maintient jusqu'à la fin de la pesée. Cependant, si on considère l'erreur standard sur la moyenne (SEM), cette différence est négligeable. De plus, un test statistique effectuée sur chacun des points individuels montre que la différence entre les souris femelles de type sauvage et les souris femelles transgéniques n'est pas significative ($P > 0,05$).

Les souris mâles, dont la croissance pondérale est mesurée en figure 3.6B, ne montrent aucunes différences entre les souris transgéniques et les souris de type sauvage. Nous voyons que les courbes pour les deux groupes de souris se chevauchent durant tout le temps où leur poids a été suivi.

On remarque que si on compare les deux sexes, les souris mâles prennent du poids plus rapidement que les souris femelles. Une telle observation correspond à l'information sur le poids des souris C57BL/6J fournie par le Laboratoire Jackson [155].

Pris ensemble, ces résultats montrent que la surexpression hépatique de notre transgène n'a pas d'effets significatifs sur la croissance pondérale des souris peu importe le sexe des animaux.

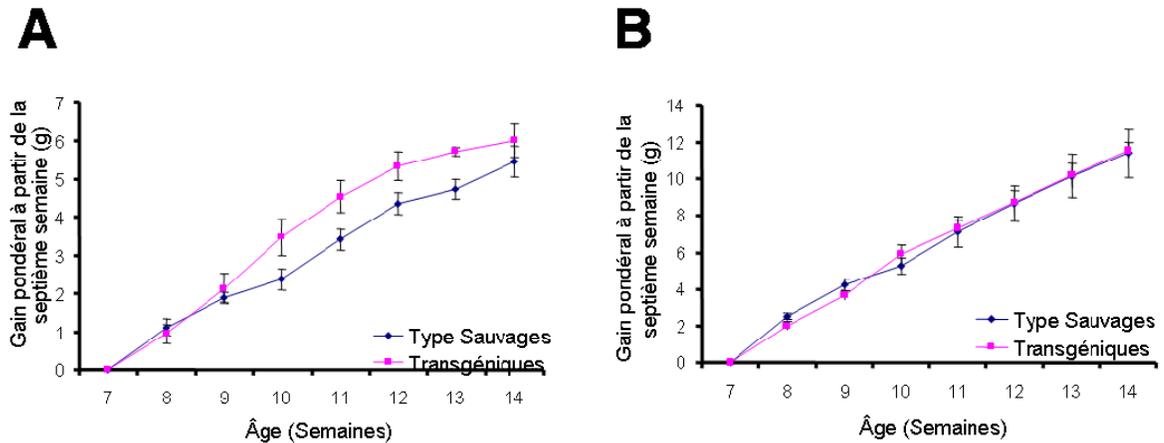


Figure 3.6 Croissance pondérale des souris transgénique

A. Des souris femelles de type sauvages (n=10) et transgéniques (n=6) ont été pesées une fois par semaine à partir de leur septième semaine de vie jusqu'à la quatorzième semaine. Par la suite, une courbe représentant la variation de leur poids moyen \pm SEM a été tracée. B. Des souris mâles de type sauvages (n=4) et transgéniques (n=6) ont été pesées une fois par semaine à partir de leur septième semaine de vie jusqu'à la quatorzième semaine, puis leur variation de poids moyen \pm SEM a été porté sur une courbe.

3.6. La glycémie des souris transgéniques

Nous nous sommes ensuite intéressés à la glycémie des souris transgéniques à jeun et à l'état postprandial, les souris étant nourries avec une diète normale. Le tableau II compare la glycémie à jeun et la glycémie à l'état nourri des souris de type sauvages et transgéniques. Comme on le constate selon les valeurs exprimées dans le tableau, il y pas de différences entre les deux groupes à l'état de jeun. Cependant, à l'état nourri, nous pouvons constater que la glycémie des souris transgéniques a tendance à être plus faible que chez les souris de type sauvage. Bien que cette différence reste non significative, elle devrait être pris en compte lors des prochaines analyses avec des groupes de taille plus

importante afin d'atténuer les effets des variations individuelles sur la moyenne de la glycémie postprandiale.

Pris ensemble, ces résultats suggèrent que la protéine PPM1A semble jouer un rôle quasiment négligeable sur les processus de contrôle de la glycémie à jeun. Par contre, un rôle plus significatif dans le contrôle de la glycémie postprandial reste cependant envisageable et donc des études futures avec des groupes de taille nettement plus grande devraient explorer cette possibilité.

Tableau II. Glycémie des souris de type sauvage vs glycémie des souris transgéniques à jeun et à l'état postprandial (moyenne \pm SEM)

	Glycémie (mmol/l)		<i>P</i>
	Souris de type sauvage (n=5)	Souris transgéniques (n=5)	
À jeun	3,94 \pm 0,15	4,13 \pm 0,36	0,7
Postprandial	7,62 \pm 0,55	6,90 \pm 0,52	0,4

3.7. La tolérance au glucose et à l'insuline des souris transgéniques

Comme l'a démontré la section précédente, il n'y a pas de différence nette entre les glycémies des souris transgéniques et de type sauvage. Cela ne signifie pas néanmoins que les deux groupes sont identiques en ce qui concerne le métabolisme du glucose et la réponse à l'insuline. Il était donc nécessaire de soumettre les souris à des conditions générant une réponse du système métabolique du glucose, afin d'évaluer s'il existe des différences à ce niveau.

Dans ce contexte, nous avons effectué des expériences de tolérance au glucose et à l'insuline sur les souris transgéniques et de type sauvage. La figure 3.7A représente les résultats du test de tolérance au glucose. Les souris ayant été préalablement privées de nourriture, on constate que leur glycémie initiale est relativement basse, aux environs de quatre à cinq mmol/l. Elle grimpe à un maximum trente minutes après le gavage de glucose, entre 15 et 20 mmol/l, pour ensuite diminuer progressivement durant les 90 minutes qui suivent. Les souris de type sauvage (ligne bleue) et transgéniques (ligne rose) suivent le même patron, et il n'y a en fait pratiquement pas de différences entre les deux groupes.

La tolérance à l'insuline est effectuée chez des souris à jeun depuis six heures. Les résultats sont présentés par la figure 3.7B sous la forme du pourcentage moyen de la glycémie initiale en fonction du temps après l'injection d'insuline. On observe que dans les deux cas, la glycémie est bien sûr à 100% initialement et qu'elle va diminuer de 80% durant la première heure après l'injection d'insuline. Jusqu'ici, les deux groupes de souris se comportent de façon identique. À partir de ce point par contre, la glycémie des souris de type sauvage reste relativement basse alors que celle des souris transgéniques commence à remonter pour qu'il y ait environ 10 à 20% de différence entre les deux groupes de souris une heure après le minimum.

Pris ensemble, ces résultats suggèrent que la réponse à une augmentation de glycémie est quasiment la même pour les deux groupes de souris, alors que leur réponse à l'insuline est légèrement différente, celle des souris transgéniques étant de plus courte durée. On observe donc une récupération plus rapide suite à une augmentation d'insuline chez les souris transgéniques. Il est cependant nécessaire reproduire l'expérience avec une population plus grande puisque le chevauchement des SEM sur le dernier point insère un doute quant à la significativité du résultat.

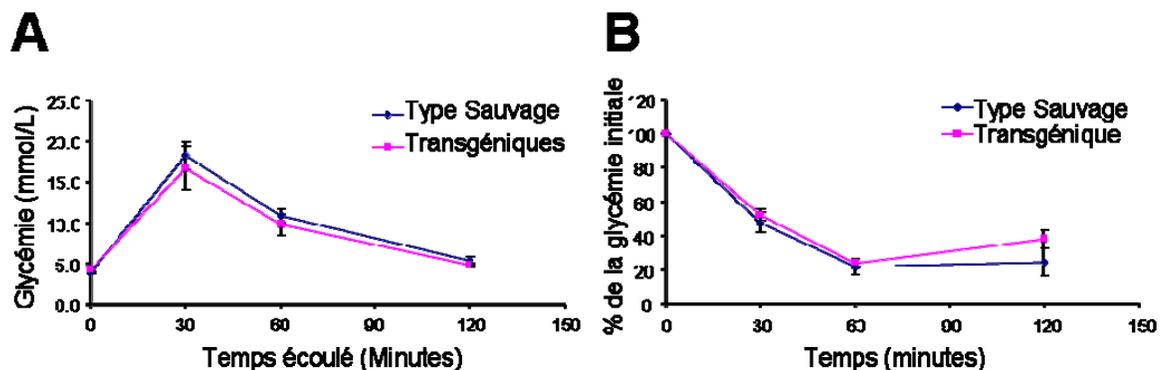


Figure 3.7 Tolérance au glucose et à l'insuline

A. Des souris de type sauvage et transgéniques ont préalablement été privées de nourriture durant douze heures. Par la suite, leur glycémie a été mesurée puis elles ont été gavées avec une solution aqueuse de glucose de façon à ce qu'elles ingèrent deux grammes de glucose par kilogramme de masse. La glycémie était ensuite mesurée aux trente minutes durant deux heures. Les résultats sont exprimés en glycémie moyenne \pm SEM en fonction du temps ($n=5$ pour chacun des groupes). B. Des souris de type sauvage et transgéniques, à jeun depuis six heures, ont été sujettes à l'injection d'insuline, après avoir mesuré leur glycémie basale, de façon à ce qu'elles reçoivent 1U d'insuline par kilogramme de masse. La glycémie était ensuite mesurée aux trente minutes durant deux heures. Les résultats sont exprimés en pourcentage moyen de la glycémie initiale \pm SEM en fonction du temps ($n=5$ pour chacun des groupes).

3.8. Le glycogène hépatique des souris transgéniques

Les résultats précédents suggèrent un rôle subtil de PPM1A dans les processus métaboliques chez les souris transgéniques dans les situations postprandiales. En effet, la montée plus rapide de la glycémie après une charge intrapéritonéale d'insuline pourrait refléter une mobilisation des réserves énergétiques des souris transgéniques plus importante. Bien que ces résultats étaient peu significatifs, il était tout de même important de s'intéresser à d'autres aspects des processus métaboliques chez nos animaux transgéniques, en commençant par mesurer l'état des réserves énergétiques.

Ainsi, nous avons décidé d'évaluer le niveau de glycogène dans les foies des souris transgéniques en comparaison avec des souris de type sauvage, puisque la glycogénogenèse est intimement liée à l'action de l'insuline. En effet, lorsque la voie de signalisation de l'insuline est activée, celle de la biosynthèse du glycogène l'est aussi. Donc si PPM1A peut d'une quelconque façon moduler la voie de l'insuline, elle devrait normalement avoir un impact similaire sur le glycogène hépatique.

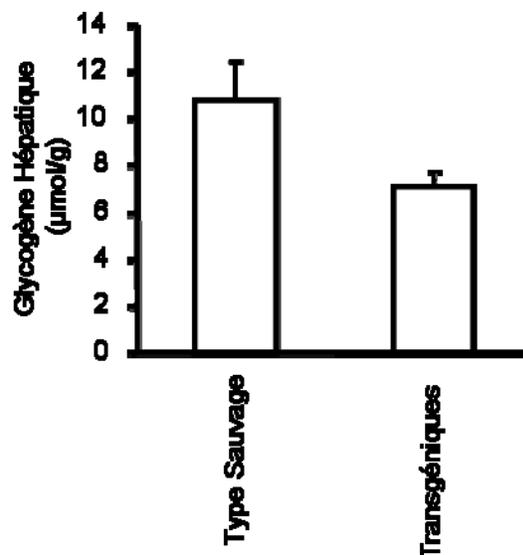


Figure 3.8 Dosage du glycogène hépatique

Des souris de type sauvage et transgéniques, nourries avec une diète de base pour les souris, ont été sacrifiées après avoir été privées de nourriture durant 6 heures et leur foie a été prélevé. Le glycogène a été par la suite extrait d'un morceau de foie et dosé. Les valeurs absolues obtenues lors des dosages ont été ensuite exprimées en fonction de la masse des morceaux de foie dosés. Chaque bande représente la moyenne \pm SEM du glycogène hépatique (n=5 pour chacun des groupes). $P=0,07$ pour cette expérience.

La figure 3.8 montre le résultat de ce dosage porté sur un histogramme. Chaque bande représente le glycogène hépatique moyen de cinq souris \pm l'erreur standard sur la moyenne. On constate rapidement que le glycogène hépatique des souris de type sauvage est plus élevé que celui des souris transgéniques. La différence est d'environ 3 à 5 $\mu\text{mol/g}$ de foie ce qui est très intéressant. Par contre, la valeur de P de cette expérience est de 0,07 ce qui n'est pas significatif. En somme, ces résultats montrent que les souris transgéniques surexprimant PPM1A dans leur foie possèdent une plus faible quantité de glycogène que les souris de type sauvage. Cependant, il sera nécessaire de reproduire ces expériences avec des groupes significativement plus grands afin d'obtenir des résultats qui démontreraient, sans équivoque l'implication de PPM1A dans la régulation de niveau du glycogène hépatique chez les animaux transgéniques.

3.9. Les triglycérides hépatiques et la triglycéridémie des souris transgéniques

La voie de signalisation AMPK/ACC intègre des informations hormonales et nutritionnelles nécessaires au contrôle de la lipogenèse et de la β -oxydation. De plus, l'AMPK a été suggéré comme un substrat possible de PPM1A *in vitro*. En supposant que la protéine phosphatase PPM1A peut déphosphoryler et inactiver l'AMPK, la surexpression de cette phosphatase dans le foie devrait donc avoir un impact direct sur les processus physiologiques qui modulent la lipogenèse et la β -oxydation. Par conséquent, la surexpression de notre transgène devrait avoir des effets directs sur la concentration des lipides hépatiques et sanguins.

Afin de tester cette hypothèse, nous avons évalué la concentration en triglycérides présents dans le foie et le plasma des souris de type sauvage et transgéniques. La figure 3.9A montre les résultats du dosage des triglycérides dans le foie de nos animaux. On y constate que le niveau de triglycérides présents y est plus élevé chez les souris de type sauvage que les souris transgéniques, de plus la différence est très significative ($P = 0,005$). L'erreur sur la moyenne étant très petite, il n'y a pas de chevauchement possible des deux valeurs.

Lorsque nous avons dosé les triglycérides dans le sang des deux groupes de souris, nous avons constaté le contraire. En effet, en observant la figure 3.9B on constate que les souris de types sauvage possèdent une triglycéridémie plus faible que les souris transgéniques. Encore un foie, l'erreur sur la moyenne ne semble pas suggérer de chevauchement entre les deux valeurs et les résultats sont toujours très significatifs ($P = 0,02$).

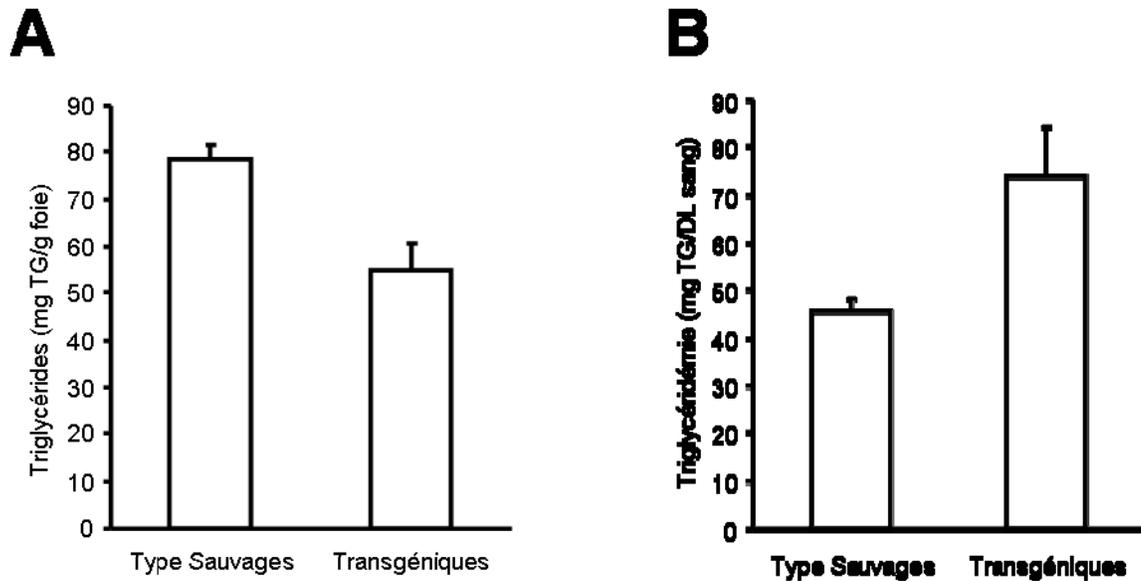


Figure 3.9 Effets de la transgénèse sur le niveau des triglycérides hépatiques et sanguins.

A. Des foies de souris de type sauvage (n=4) et transgénique (n=3), à jeun depuis 6 heures, ont été prélevés. Les triglycérides sont extraits de ceux-ci et dosés par spectrophotométrie. Chaque bande représente la moyenne du niveau de triglycérides du groupe de souris dosé en duplicata \pm SEM (P= 0,005). B. La totalité du sang de souris de type sauvage (n=4) et transgénique (n=3), à jeun depuis 6 heures, a été récupérée par ponction cardiaque lors de leur sacrifice. Les triglycérides ont ensuite été dosés sur le plasma et portés sur un histogramme. Chaque bande représente la moyenne de la triglycéridémie du groupe de souris dosé en duplicata \pm SEM (P=0,02).

Pris ensemble, ces résultats montrent que la surexpression de PPM1A dans le foie de nos souris induit la déplétion dans le foie de ses triglycérides et augmente le niveau des triglycérides dans la circulation des souris transgéniques. Ces résultats suggèrent donc que la surexpression de PPM1A hépatique a probablement peu d'effet sur les processus de synthèse des triglycérides, mais par contre devrait avoir des effets très importants sur les processus de sécrétion des lipoprotéines.

4. DISCUSSION

Un rôle physiologique de la protéine phosphatase PPM1A dans les processus métaboliques a été précédemment suggéré. Cependant, on trouve peu d'études sur ce sujet. L'absence des inhibiteurs chimiques conjugués à l'absence d'un modèle animal (perte de fonction ou gain de fonction) sont les raisons principales qui pourraient expliquer la rareté des travaux sur les fonctions physiologiques de la protéine phosphatase PPM1A. Ainsi, et dans le but d'éclairer le rôle physiologique de cette protéine phosphatase dans les processus métaboliques, nous avons décidé de générer un modèle animal qui exprime le gène humain PPM1A dans le foie. Nous avons choisi le foie comme organe cible puisqu'il joue un rôle primordial dans l'homéostasie du glucose et des lipides. De plus, le foie est grandement impliqué dans les processus de développement de la résistance à l'insuline et des maladies métaboliques qui y sont associées telles que le diabète et les anomalies lipidiques. [156]

4.1. Génération des souris transgéniques

La première partie de l'étude consistait à générer des souris surexprimant PPM1A dans le foie. Il fallait donc dans un premier temps générer un vecteur fonctionnel qui surexprimerait la phosphatase PPM1A dans des hépatocytes tels que les cellules HepG2. Ensuite, il était nécessaire de purifier la cassette transgénique et de la faire injecter dans des ovocytes de souris d'une souche de notre choix (C57BL6/J). Enfin, il fallait identifier les souris transgéniques positives et s'assurer que le transgène s'exprime bien dans le foie.

La fonctionnalité du vecteur était étudiée en deux temps. Dans un premier temps, nous avons validé que le promoteur était bien fonctionnel, puis nous avons démontré que l'ajout des épitopes Myc/His sur le côté C-terminale de PPM1A n'a pas d'effet néfaste sur l'activité phosphatasique de la protéine chimérique hPPM1A-Myc/His.

L'expression de la protéine transgénique en grande quantité dans des cellules hépatiques HepG2 témoigne que le promoteur TTR permet la surexpression de la protéine dans le foie et nous conforte dans notre approche (figure 3.2a et b).

En co-transfectant PPM1A-Myc/His et JNK et en stimulant les cellules surexprimant ces deux protéines avec du $TNF\alpha$, nous avons reproduit une expérience effectuée dans un des premiers articles sur PPM1A afin de démontrer que la taille et la position des épitopes ajoutés ne nuisaient pas à l'activité de la protéine. Le résultat, sans démontrer directement l'activité de la protéine, suggère que celle-ci est bel et bien active puisque JNK n'est pas phosphorylée en présence de PPM1A-Myc/His de type sauvage, lorsque l'on traite les

cellules au TNF α (figure 3.2c). Une autre approche consisterait à purifier la protéine et faire des essais pour son activité enzymatique *in vitro*. Une telle approche est par contre beaucoup plus laborieuse que la solution simple pour laquelle nous avons optée.

Pris ensemble, nos résultats montrent que nous sommes bien parvenus à générer un vecteur transgénique fonctionnel basé sur le plasmide pSP72 et contenant une séquence nucléotidique codant pour une protéine chimérique PPM1A-Myc/His sous le contrôle du promoteur du gène transthyréline ce qui va nous garantir une expression constitutive et localisée aux hépatocytes des souris transgéniques.

4.2. Identification de souris transgéniques

Une fois le vecteur de transgène généré et validé, nous avons procédé à la digestion d'une grande quantité (environ 250 μ g) de ce vecteur afin de purifier la cassette transgénique nécessaire pour la micro-injection d'environ 600 ovocytes de souris C57BL6/J. Vingt-quatre heures après la micro-injection, ces ovocytes furent implantés dans des souris femelles pseudogestantes. Les souris transgéniques générées de cette façon étaient génotypées par PCR en utilisant des amorces qui amplifient spécifiquement le transgène. Ces analyses ont révélé l'intégration de transgène dans le génome de cinq nouveau-nés, ce qui correspond à l'intégration de notre transgène dans 1% des ovocytes microinjectés, un résultat semblable à ce qu'on trouve dans la littérature pour des expériences similaires. Les cinq souris transgéniques ont été ensuite croisées avec des souris de type sauvage C57BL6/J afin d'obtenir la première génération de souris hémizygotés hPPM1A-Myc/His et d'établir une colonie de souris transgéniques PPM1A-Myc/His sur un fond génétique C57BL6/J pur. Cette souche de souris est couramment utilisée pour étudier les phénotypes des souris transgéniques à cause de fond génétique très pur et permissif. De plus, sa haute susceptibilité à développer l'obésité et le diabète de type 2, par une alimentation hypercalorique, en faisait une lignée idéale pour l'étude de transgène PPM1A-Myc/His dans le cadre des recherches de notre laboratoire. [157]

Bien que les analyses par PCR nous confirment l'intégration de la cassette transgénique dans le génome des souris identifiées comme étant des souris transgéniques, cette méthode, cependant, nous nous garantie jamais une expression protéique adéquate (forte et localisé dans les hépatocytes). Il était donc important de montrer que la protéine transgénique s'exprimait comme elle aurait dû. Donc, par immunobuvardage contre l'épitope Myc et

contre la protéine PPM1A, nous avons pu démontrer que les souris génotypées positives expriment bien notre protéine chimérique dans le foie et que la surexpression est au moins cinq fois plus élevée que le niveau de la protéine endogène (figure 3.3b). Une telle surexpression a été jugée comme une surexpression idéale pour nos études.

4.3. Caractérisation de phénotype des souris transgéniques

Ayant généré des souris qui surexpriment la protéine phosphatase PPM1A-Myc/His exclusivement dans leurs hépatocytes, notre principal objectif a été par la suite d'établir une colonie de ces animaux transgéniques.

Le deuxième grand objectif a été l'identification du phénotype de ces souris et l'étude de l'effet de la surexpression de PPM1A-Myc/His dans le foie sur un organisme entier.

L'approche générale pour laquelle nous avons opté était de d'abord étudier des facteurs externes au foie, car la plupart de ceux-ci ne nécessitent pas de sacrifier les souris et permettent donc de débiter l'étude quand la colonie est plus petite, pour éventuellement en venir au foie et à l'étude directe des protéines.

Donc dans un premier temps, nous avons suivi la croissance pondérale des souris transgéniques. Pendant sept semaines, nous avons pesé une fois par semaine les souris des deux groupes et exprimé les résultats sous forme d'une courbe telle qu'observée à la figure 3.5. Ce qu'on constate dans cette figure, c'est qu'il n'y a peu ou pas de différence entre les souris de type sauvage et les souris transgéniques, et ce, indépendamment du sexe. Il semble par contre que dans le cas des souris femelles (3.5a), les deux courbes semblent vouloir se dissocier, mais la séparation n'est pas très convaincante vu l'incertitude sur ces deux courbes. En conséquence, il serait nécessaire de répéter l'expérience avec plus de souris et sur une plus longue période (c.-à-d. de la 3^e semaine et jusqu'à la 20^e semaine).

Dans un second temps, nous avons mesuré la glycémie des souris à jeun et en postprandiale chez les souris nourries avec une diète de base. Nos résultats n'ont pas pu démontrer des différences significatives entre la glycémie à jeun entre les souris transgéniques et les souris de type sauvage. Par contre à l'état postprandial, nous avons observé que la glycémie des souris transgéniques tend à être plus basse que la glycémie postprandiale des souris de type sauvage. Cependant, cette différence reste non significative. Donc, ces résultats devraient être complétés en mesurant la glycémie à jeun et postprandiale sur un plus grand nombre de souris.

Ensuite, nous avons décidé d'évaluer la réponse des souris transgéniques à une charge glucidique (glucose tolérance test) et à une charge d'insuline (insuline tolérance test). Dans le cas du test de tolérance au glucose, nous n'avons pu mettre en évidence la moindre différence entre les deux groupes (figure 3.7a). Par contre, lors du test de tolérance à l'insuline, nous avons observé une tendance à l'échappement de l'hypoglycémie plus précoce chez les souris transgéniques que chez les souris de type sauvage. Au moins deux mécanismes, non exclusifs, pourraient être à l'origine de ce phénomène : 1) un catabolisme plus important de l'insuline circulante chez les souris transgéniques que chez les souris de type sauvage et 2) une mobilisation plus précoce des réserves énergétiques chez les souris transgéniques.

Par la suite, nous avons évalué les réserves énergétiques hépatiques chez nos souris. Tout d'abord, nous avons mesuré la quantité de glycogène hépatique par unité de masse chez des souris de type sauvage et transgéniques, nourries avec une diète de base pour les souris. Nos résultats démontrent que la quantité de glycogène dans le foie des souris transgéniques était plus faible que celle des souris de type sauvage. Donc, la diminution de la quantité de glycogène dans le foie des souris transgéniques pourrait être la conséquence d'une mobilisation accrue de ces réserves énergétiques chez ces animaux. Cependant, il n'est pas à exclure que PPM1A agisse directement sur certaines voies de signalisations qui contrôlent la biosynthèse du glycogène par le biais de la protéine GSK3 β . [158] Deux voies en particulier parmi celles-ci seraient intéressantes à étudier dans les souris PPM1A. D'abord, la voie de signalisation de l'insuline, qui contrôle directement l'activité de GSK3 β . Il a été montré que dans les tissus adipeux, PPM1A augmente la sensibilité de la voie de signalisation par l'insuline. [147] Ensuite, il est à considérer une action possible de PPM1A sur la signalisation par la mélatonine. En effet, on sait que les souris C57BL6/J ne synthétisent pas de mélatonine [159], et que la mélatonine favorise la biosynthèse du glycogène par le biais de la signalisation par la PKC [160], qui elle-même affecte la signalisation par l'insuline. Il se pourrait donc que PPM1A antagonise la signalisation par la mélatonine et réduise ainsi la biosynthèse de glycogène par le biais de la voie PKC. Cet impact potentiel sur la signalisation par la mélatonine serait à étudier dans un système *in vitro* en surexprimant PPM1A dans des cellules hépatiques qui seraient par la suite stimulées avec une faible quantité de mélatonine et d'insuline, puis en observant l'impact sur la signalisation par l'insuline.

Enfin, nous nous sommes intéressés aux triglycérides hépatiques et plasmatiques. L'expérience en figure 3.9 nous a permis d'observer que les souris transgéniques ont moins de triglycérides hépatiques, mais une plus grande triglycéridémie. Ces résultats suggèrent fortement que le foie des souris de deux groupes synthétise une quantité de triglycérides sensiblement comparable, mais que le foie des souris surexprimant notre transgène libère davantage des triglycérides dans la circulation sous forme des VLDL que le foie des souris de type sauvage. En effet, le transport des triglycérides à partir du foie se fait par le biais des lipoprotéines de très faible densité (Very Low Density Lipoproteins) [161] qui sont formées autour de la protéine ApoB. Leur biosynthèse est contrôlée par une petite protéine du RE nommée MTP, qui catalyse le transfert de lipides sur la protéine ApoB naissante pour ainsi former les VLDL [162]. Comme il a été montré que la stimulation de cellules HepG2 avec de l'insuline réduit l'expression de MTP [163], il est possible que PPM1A permette dans le foie une plus forte expression de la protéine MTP en antagonisant la voie de signalisation par le récepteur insuline, ce qui est supporté par la diminution du niveau de glycogène observé dans le foie des souris transgéniques.

Pris ensemble, les analyses de phénotype de nos souris transgéniques mettent clairement en évidence que la protéine phosphatase PPM1A a un rôle important dans les processus métaboliques, puisque nous avons pu démontrer que la surexpression de cette protéine modifie les réserves énergétiques (glucidique et lipidique) dans le foie de nos animaux transgéniques.

La prochaine étape dans ce projet serait donc d'identifier la ou les cible(s) de PPM1A et d'étudier le mécanisme moléculaire par lequel cette phosphatase exerce son rôle. Dans ce contexte, il serait essentiel de s'intéresser au niveau d'expression et de phosphorylation des protéines de la voie de signalisation par le récepteur insuline dans le foie des souris transgéniques comparativement à celui des souris de type sauvage, et de d'autres protéine dont l'activité est associée à la voie de signalisation par le récepteur insuline en amont ou en aval, tels que MTP et PKC. Il faudrait par la suite confirmer ces résultats dans des expériences *in vitro* dans des cellules en culture.

Dans le futur, considérant l'importance de la signalisation par le récepteur insuline dans les tissus adipeux, et le rôle *in vitro* déjà démontré de PPM1A, il serait intéressant de générer des souris transgéniques surexprimant PPM1A dans leurs tissus adipeux. Celles-ci peuvent être générées en remplaçant le promoteur TTR par celui d'aP2 [164], une protéine homologue à la myéline P2 qui n'est exprimée que dans les adipocytes différenciés [165].

5. CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Dans le cadre de ce projet, nous avons généré des souris transgéniques surexprimant la protéine phosphatase PPM1A dans leur foie afin d'établir le rôle de cette protéine phosphatase dans les processus métaboliques, la sensibilité à l'insuline et les processus de développement de la résistance à l'insuline et les anomalies métaboliques associées.

Nous avons montré dans un premier temps que les souris ainsi obtenues surexpriment la protéine transgénique uniquement dans le foie. Dans un second temps, nous avons pu démontrer que la surexpression de PPM1A dans le foie n'affectait pas la croissance pondérale ni la glycémie à jeun. Par contre, à l'état postprandial, la surexpression de PPM1A semble induire une légère diminution de la glycémie. Ensuite les tests de tolérance au glucose et à l'insuline ont suggéré un nouveau rôle pour la protéine PPM1A. En effet, les résultats de ces tests suggèrent que la protéine PPM1A hépatique pourrait moduler les réserves énergétiques dans le foie. Les analyses subséquentes ont confirmé cette tendance et elles ont mis en évidence que la surexpression de la protéine phosphatase PPM1A dans les hépatocytes des souris déplete ces cellules de leurs réserves en glycogène et en triglycérides. Ces effets sont concomitants avec une augmentation de la triglycéridémie.

Dans le futur, il sera nécessaire d'étudier l'effet de la surexpression de PPM1A sur les voies de signalisation de l'insuline et de l'AMPK afin de déterminer d'où proviennent les différences observées dans le cadre de ce projet et d'identifier des substrats potentiels à la protéine phosphatase PPM1A. Il serait de plus intéressant d'étudier les variations d'expression dans les différentes protéines impliquées dans la synthèse et la sécrétion des lipoprotéines. Enfin, pour compléter le tableau en ce qui concerne les lipides, il faudrait procéder au dosage du cholestérol dans le foie et dans la circulation.

6. RÉFÉRENCES

6. Références

1. Diabète, A.C.d., *La prévalence et les coûts du diabète*, A.C.d. Diabète, Editor. 2008, Association Canadienne du Diabète. p. 2.
2. Ford, E.S., W.H. Giles, and W.H. Dietz, *Prevalence of the metabolic syndrome among US adults: findings from the third National Health and Nutrition Examination Survey*. *Jama*, 2002. **287**(3): p. 356-9.
3. Arderm, C.I., et al., *Discrimination of health risk by combined body mass index and waist circumference*. *Obes Res*, 2003. **11**(1): p. 135-42.
4. Moller, D.E. and K.D. Kaufman, *Metabolic syndrome: a clinical and molecular perspective*. *Annu Rev Med*, 2005. **56**: p. 45-62.
5. Bouchard, C., *Genetic factors in the regulation of adipose tissue distribution*. *Acta Med Scand Suppl*, 1988. **723**: p. 135-41.
6. Moller, D.E., C. Bjorbaek, and A. Vidal-Puig, *Candidate genes for insulin resistance*. *Diabetes Care*, 1996. **19**(4): p. 396-400.
7. Nabel, E.G., *Cardiovascular disease*. *N Engl J Med*, 2003. **349**(1): p. 60-72.
8. Bouchard, C., J.P. Despres, and P. Mauriege, *Genetic and nongenetic determinants of regional fat distribution*. *Endocr Rev*, 1993. **14**(1): p. 72-93.
9. Qatanani, M. and M.A. Lazar, *Mechanisms of obesity-associated insulin resistance: many choices on the menu*. *Genes Dev*, 2007. **21**(12): p. 1443-55.
10. Grundy, S.M., *A constellation of complications: the metabolic syndrome*. *Clin Cornerstone*, 2005. **7**(2-3): p. 36-45.
11. Murphy, K., S. Connor, and A. O'Dwyer, *Descriptions des états de santé au Canada: Diabète*, in *Descriptions des états de santé au Canada*, S. Canada, Editor. 2005, Statistiques Canada: Ottawa.
12. Zimmet, P., K.G. Alberti, and J. Shaw, *Global and societal implications of the diabetes epidemic*. *Nature*, 2001. **414**(6865): p. 782-7.
13. Wyatt, S.B., K.P. Winters, and P.M. Dubbert, *Overweight and obesity: prevalence, consequences, and causes of a growing public health problem*. *Am J Med Sci*, 2006. **331**(4): p. 166-74.
14. Schulze, M.B. and F.B. Hu, *Primary prevention of diabetes: what can be done and how much can be prevented?* *Annu Rev Public Health*, 2005. **26**: p. 445-67.
15. Charles, M.A., E. Eschwege, and P.H. Bennett, *[Non-insulin-dependent diabetes in populations at risk: the Pima Indians]*. *Diabetes Metab*, 1997. **23 Suppl 4**: p. 6-9.
16. Saltiel, A.R. and C.R. Kahn, *Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism*. *Nature*, 2001. **414**(6865): p. 799-806.
17. Ullrich, A., et al., *Human insulin receptor and its relationship to the tyrosine kinase family of oncogenes*. *Nature*, 1985. **313**(6005): p. 756-61.
18. White, M.F. and C.R. Kahn, *Cascade of autophosphorylation in the beta-subunit of the insulin receptor*. *J Cell Biochem*, 1989. **39**(4): p. 429-41.
19. De Meyts, P., *The structural basis of insulin and insulin-like growth factor-I receptor binding and negative co-operativity, and its relevance to mitogenic versus metabolic signalling*. *Diabetologia*, 1994. **37 Suppl 2**: p. S135-48.
20. Kavanaugh, W.M. and L.T. Williams, *An alternative to SH2 domains for binding tyrosine-phosphorylated proteins*. *Science*, 1994. **266**(5192): p. 1862-5.
21. Sadowski, I., J.C. Stone, and T. Pawson, *A noncatalytic domain conserved among cytoplasmic protein-tyrosine kinases modifies the kinase function and transforming*

- activity of Fujinami sarcoma virus P130gag-fps. *Mol Cell Biol*, 1986. **6**(12): p. 4396-408.
22. Sun, X.J., et al., *Expression and function of IRS-1 in insulin signal transmission*. *J Biol Chem*, 1992. **267**(31): p. 22662-72.
 23. Sun, X.J., et al., *Structure of the insulin receptor substrate IRS-1 defines a unique signal transduction protein*. *Nature*, 1991. **352**(6330): p. 73-7.
 24. Sun, X.J., et al., *Role of IRS-2 in insulin and cytokine signalling*. *Nature*, 1995. **377**(6545): p. 173-7.
 25. Gual, P., Y. Le Marchand-Brustel, and J.F. Tanti, *Positive and negative regulation of insulin signaling through IRS-1 phosphorylation*. *Biochimie*, 2005. **87**(1): p. 99-109.
 26. Nishiyama, M. and J.R. Wands, *Cloning and increased expression of an insulin receptor substrate-1-like gene in human hepatocellular carcinoma*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1992. **183**(1): p. 280-5.
 27. Carpenter, C.L., et al., *Phosphoinositide 3-kinase is activated by phosphopeptides that bind to the SH2 domains of the 85-kDa subunit*. *J Biol Chem*, 1993. **268**(13): p. 9478-83.
 28. Inukai, K., et al., *p85alpha gene generates three isoforms of regulatory subunit for phosphatidylinositol 3-kinase (PI 3-Kinase), p50alpha, p55alpha, and p85alpha, with different PI 3-kinase activity elevating responses to insulin*. *J Biol Chem*, 1997. **272**(12): p. 7873-82.
 29. Shepherd, P.R., et al., *Differential regulation of phosphoinositide 3-kinase adapter subunit variants by insulin in human skeletal muscle*. *J Biol Chem*, 1997. **272**(30): p. 19000-7.
 30. Taniguchi, C.M., B. Emanuelli, and C.R. Kahn, *Critical nodes in signalling pathways: insights into insulin action*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2006. **7**(2): p. 85-96.
 31. Hiles, I.D., et al., *Phosphatidylinositol 3-kinase: structure and expression of the 110 kd catalytic subunit*. *Cell*, 1992. **70**(3): p. 419-29.
 32. Hu, P., et al., *Cloning of a novel, ubiquitously expressed human phosphatidylinositol 3-kinase and identification of its binding site on p85*. *Mol Cell Biol*, 1993. **13**(12): p. 7677-88.
 33. Whitman, M., et al., *Type I phosphatidylinositol kinase makes a novel inositol phospholipid, phosphatidylinositol-3-phosphate*. *Nature*, 1988. **332**(6165): p. 644-6.
 34. Damen, J.E., et al., *The 145-kDa protein induced to associate with Shc by multiple cytokines is an inositol tetrakisphosphate and phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate 5-phosphatase*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996. **93**(4): p. 1689-93.
 35. Li, J., et al., *PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer*. *Science*, 1997. **275**(5308): p. 1943-7.
 36. Mayer, B.J., et al., *A putative modular domain present in diverse signaling proteins*. *Cell*, 1993. **73**(4): p. 629-30.
 37. Alessi, D.R., et al., *Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase Balpha*. *Curr Biol*, 1997. **7**(4): p. 261-9.
 38. Cohen, P., D.R. Alessi, and D.A. Cross, *PDK1, one of the missing links in insulin signal transduction?* *FEBS Lett*, 1997. **410**(1): p. 3-10.
 39. Brozinick, J.T., Jr. and M.J. Birnbaum, *Insulin, but not contraction, activates Akt/PKB in isolated rat skeletal muscle*. *J Biol Chem*, 1998. **273**(24): p. 14679-82.
 40. Stokoe, D., et al., *Dual role of phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate in the activation of protein kinase B*. *Science*, 1997. **277**(5325): p. 567-70.

41. Manning, B.D. and L.C. Cantley, *AKT/PKB signaling: navigating downstream*. Cell, 2007. **129**(7): p. 1261-74.
42. Turner, R.J. and M. Silverman, *Sugar uptake into brush border vesicles from normal human kidney*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1977. **74**(7): p. 2825-9.
43. Bodo, R. and H.P. Marks, *The action of insulin on the perfused mammalian liver*. J Physiol, 1928. **65**(1): p. 48-62.
44. Ahmad, F. and B.J. Goldstein, *Functional association between the insulin receptor and the transmembrane protein-tyrosine phosphatase LAR in intact cells*. J Biol Chem, 1997. **272**(1): p. 448-57.
45. Lammers, R., N.P. Moller, and A. Ullrich, *The transmembrane protein tyrosine phosphatase alpha dephosphorylates the insulin receptor in intact cells*. FEBS Lett, 1997. **404**(1): p. 37-40.
46. Bandyopadhyay, D., et al., *Protein-tyrosine phosphatase 1B complexes with the insulin receptor in vivo and is tyrosine-phosphorylated in the presence of insulin*. J Biol Chem, 1997. **272**(3): p. 1639-45.
47. Seely, B.L., et al., *Protein tyrosine phosphatase 1B interacts with the activated insulin receptor*. Diabetes, 1996. **45**(10): p. 1379-85.
48. Goldstein, B.J., et al., *Tyrosine dephosphorylation and deactivation of insulin receptor substrate-1 by protein-tyrosine phosphatase 1B. Possible facilitation by the formation of a ternary complex with the Grb2 adaptor protein*. J Biol Chem, 2000. **275**(6): p. 4283-9.
49. Elchebly, M., et al., *Increased insulin sensitivity and obesity resistance in mice lacking the protein tyrosine phosphatase-1B gene*. Science, 1999. **283**(5407): p. 1544-8.
50. Klamann, L.D., et al., *Increased energy expenditure, decreased adiposity, and tissue-specific insulin sensitivity in protein-tyrosine phosphatase 1B-deficient mice*. Mol Cell Biol, 2000. **20**(15): p. 5479-89.
51. Aguirre, V., et al., *The c-Jun NH(2)-terminal kinase promotes insulin resistance during association with insulin receptor substrate-1 and phosphorylation of Ser(307)*. J Biol Chem, 2000. **275**(12): p. 9047-54.
52. Lee, Y.H., et al., *c-Jun N-terminal kinase (JNK) mediates feedback inhibition of the insulin signaling cascade*. J Biol Chem, 2003. **278**(5): p. 2896-902.
53. Hirosumi, J., et al., *A central role for JNK in obesity and insulin resistance*. Nature, 2002. **420**(6913): p. 333-6.
54. Fujishiro, M., et al., *Three mitogen-activated protein kinases inhibit insulin signaling by different mechanisms in 3T3-L1 adipocytes*. Mol Endocrinol, 2003. **17**(3): p. 487-97.
55. Bjorntorp, P., H. Bergman, and E. Varnauskas, *Plasma free fatty acid turnover rate in obesity*. Acta Med Scand, 1969. **185**(4): p. 351-6.
56. Gordon, E.S., *Lipid Metabolism, Diabetes Mellitus, and Obesity*. Adv Intern Med, 1964. **12**: p. 66-102.
57. Jensen, M.D., et al., *Influence of body fat distribution on free fatty acid metabolism in obesity*. J Clin Invest, 1989. **83**(4): p. 1168-73.
58. Randle, P.J., et al., *The glucose fatty-acid cycle. Its role in insulin sensitivity and the metabolic disturbances of diabetes mellitus*. Lancet, 1963. **1**(7285): p. 785-9.
59. Shulman, G.I., *Cellular mechanisms of insulin resistance*. J Clin Invest, 2000. **106**(2): p. 171-6.
60. Coll, T., et al., *Oleate Reverses Palmitate-induced Insulin Resistance and Inflammation in Skeletal Muscle Cells*. J Biol Chem, 2008. **283**(17): p. 11107-16.

61. Hunnicutt, J.W., et al., *Saturated fatty acid-induced insulin resistance in rat adipocytes*. Diabetes, 1994. **43**(4): p. 540-5.
62. Itani, S.I., et al., *Lipid-induced insulin resistance in human muscle is associated with changes in diacylglycerol, protein kinase C, and IkappaB-alpha*. Diabetes, 2002. **51**(7): p. 2005-11.
63. Jaeschke, A. and R.J. Davis, *Metabolic stress signaling mediated by mixed-lineage kinases*. Mol Cell, 2007. **27**(3): p. 498-508.
64. Trushin, S.A., et al., *Protein kinase C and calcineurin synergize to activate IkappaB kinase and NF-kappaB in T lymphocytes*. J Biol Chem, 1999. **274**(33): p. 22923-31.
65. Gao, Z., et al., *Serine phosphorylation of insulin receptor substrate 1 by inhibitor kappa B kinase complex*. J Biol Chem, 2002. **277**(50): p. 48115-21.
66. Ichimura, A., et al., *Free fatty acid receptors act as nutrient sensors to regulate energy homeostasis*. Prostaglandins Other Lipid Mediat, 2009. **89**(3-4): p. 82-8.
67. Bastard, J.P., et al., *Adipose tissue IL-6 content correlates with resistance to insulin activation of glucose uptake both in vivo and in vitro*. J Clin Endocrinol Metab, 2002. **87**(5): p. 2084-9.
68. Feinstein, R., et al., *Tumor necrosis factor-alpha suppresses insulin-induced tyrosine phosphorylation of insulin receptor and its substrates*. J Biol Chem, 1993. **268**(35): p. 26055-8.
69. Ozcan, U., et al., *Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type 2 diabetes*. Science, 2004. **306**(5695): p. 457-61.
70. Szegezdi, E., et al., *Mediators of endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis*. EMBO Rep, 2006. **7**(9): p. 880-5.
71. Zhang, Y., et al., *Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue*. Nature, 1994. **372**(6505): p. 425-32.
72. Maeda, K., et al., *Analysis of an expression profile of genes in the human adipose tissue*. Gene, 1997. **190**(2): p. 227-35.
73. Bates, S.H. and M.G. Myers, Jr., *The role of leptin receptor signaling in feeding and neuroendocrine function*. Trends Endocrinol Metab, 2003. **14**(10): p. 447-52.
74. Elmquist, J.K., et al., *Unraveling the central nervous system pathways underlying responses to leptin*. Nat Neurosci, 1998. **1**(6): p. 445-50.
75. Friedman, J.M. and J.L. Halaas, *Leptin and the regulation of body weight in mammals*. Nature, 1998. **395**(6704): p. 763-70.
76. Chandran, M., et al., *Adiponectin: more than just another fat cell hormone?* Diabetes Care, 2003. **26**(8): p. 2442-50.
77. Diez, J.J. and P. Iglesias, *The role of the novel adipocyte-derived hormone adiponectin in human disease*. Eur J Endocrinol, 2003. **148**(3): p. 293-300.
78. Berg, A.H., T.P. Combs, and P.E. Scherer, *ACRP30/adiponectin: an adipokine regulating glucose and lipid metabolism*. Trends Endocrinol Metab, 2002. **13**(2): p. 84-9.
79. Moore, G.B., et al., *Differential regulation of adipocytokine mRNAs by rosiglitazone in db/db mice*. Biochem Biophys Res Commun, 2001. **286**(4): p. 735-41.
80. Swanson, R.V., L.A. Alex, and M.I. Simon, *Histidine and aspartate phosphorylation: two-component systems and the limits of homology*. Trends Biochem Sci, 1994. **19**(11): p. 485-90.
81. Hunter, T., *Protein kinases and phosphatases: the yin and yang of protein phosphorylation and signaling*. Cell, 1995. **80**(2): p. 225-36.

82. Tonks, N.K., *Protein tyrosine phosphatases: from genes, to function, to disease*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2006. **7**(11): p. 833-46.
83. Brindley, D.N., *Lipid phosphate phosphatases and related proteins: signaling functions in development, cell division, and cancer*. J Cell Biochem, 2004. **92**(5): p. 900-12.
84. Rigden, D.J., *The histidine phosphatase superfamily: structure and function*. Biochem J, 2008. **409**(2): p. 333-48.
85. Jeffrey, K.L., et al., *Targeting dual-specificity phosphatases: manipulating MAP kinase signalling and immune responses*. Nat Rev Drug Discov, 2007. **6**(5): p. 391-403.
86. Andreassen, P.R., et al., *Differential subcellular localization of protein phosphatase-1 alpha, gamma1, and delta isoforms during both interphase and mitosis in mammalian cells*. J Cell Biol, 1998. **141**(5): p. 1207-15.
87. da Cruz e Silva, E.F., et al., *Differential expression of protein phosphatase 1 isoforms in mammalian brain*. J Neurosci, 1995. **15**(5 Pt 1): p. 3375-89.
88. Shima, H., et al., *Protein phosphatase 1 gamma 2 is associated with nuclei of meiotic cells in rat testis*. Biochem Biophys Res Commun, 1993. **194**(2): p. 930-7.
89. Cohen, P.T., *Protein phosphatase 1--targeted in many directions*. J Cell Sci, 2002. **115**(Pt 2): p. 241-56.
90. Cohen, P.T., *Novel protein serine/threonine phosphatases: variety is the spice of life*. Trends Biochem Sci, 1997. **22**(7): p. 245-51.
91. Mayer-Jaekel, R.E. and B.A. Hemmings, *Protein phosphatase 2A--a 'menage a trois'*. Trends Cell Biol, 1994. **4**(8): p. 287-91.
92. Zolnierowicz, S., *Type 2A protein phosphatase, the complex regulator of numerous signaling pathways*. Biochem Pharmacol, 2000. **60**(8): p. 1225-35.
93. Groves, M.R., et al., *The structure of the protein phosphatase 2A PR65/A subunit reveals the conformation of its 15 tandemly repeated HEAT motifs*. Cell, 1999. **96**(1): p. 99-110.
94. Khew-Goodall, Y., et al., *Structure and transcriptional regulation of protein phosphatase 2A catalytic subunit genes*. Biochemistry, 1991. **30**(1): p. 89-97.
95. Forester, C.M., et al., *Control of mitotic exit by PP2A regulation of Cdc25C and Cdk1*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(50): p. 19867-72.
96. Karaiskou, A., et al., *Phosphatase 2A and polo kinase, two antagonistic regulators of cdc25 activation and MPF auto-amplification*. J Cell Sci, 1999. **112** (Pt 21): p. 3747-56.
97. Maton, G., et al., *Differential regulation of Cdc2 and Aurora-A in Xenopus oocytes: a crucial role of phosphatase 2A*. J Cell Sci, 2005. **118**(Pt 11): p. 2485-94.
98. Millward, T.A., S. Zolnierowicz, and B.A. Hemmings, *Regulation of protein kinase cascades by protein phosphatase 2A*. Trends Biochem Sci, 1999. **24**(5): p. 186-91.
99. Wadzinski, B.E., et al., *Nuclear protein phosphatase 2A dephosphorylates protein kinase A-phosphorylated CREB and regulates CREB transcriptional stimulation*. Mol Cell Biol, 1993. **13**(5): p. 2822-34.
100. Wheat, W.H., W.J. Roesler, and D.J. Klemm, *Simian virus 40 small tumor antigen inhibits dephosphorylation of protein kinase A-phosphorylated CREB and regulates CREB transcriptional stimulation*. Mol Cell Biol, 1994. **14**(9): p. 5881-90.
101. Al-Murrani, S.W., J.R. Woodgett, and Z. Damuni, *Expression of I2PP2A, an inhibitor of protein phosphatase 2A, induces c-Jun and AP-1 activity*. Biochem J, 1999. **341** (Pt 2): p. 293-8.

102. Klee, C.B., T.H. Crouch, and M.H. Krinks, *Calcineurin: a calcium- and calmodulin-binding protein of the nervous system*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1979. **76**(12): p. 6270-3.
103. Klee, C.B., G.F. Draetta, and M.J. Hubbard, *Calcineurin*. Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol, 1988. **61**: p. 149-200.
104. Wallace, R.W., E.A. Tallant, and W.Y. Cheung, *High levels of a heat-labile calmodulin-binding protein (CaM-BP80) in bovine neostriatum*. Biochemistry, 1980. **19**(9): p. 1831-7.
105. Dawson, T.M., et al., *Immunosuppressant FK506 enhances phosphorylation of nitric oxide synthase and protects against glutamate neurotoxicity*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(21): p. 9808-12.
106. Gaestel, M., et al., *Dephosphorylation of the small heat shock protein hsp25 by calcium/calmodulin-dependent (type 2B) protein phosphatase*. J Biol Chem, 1992. **267**(30): p. 21607-11.
107. Goto, S., et al., *Dephosphorylation of microtubule-associated protein 2, tau factor, and tubulin by calcineurin*. J Neurochem, 1985. **45**(1): p. 276-83.
108. Herskovits, J.S., et al., *Effects of mutant rat dynamin on endocytosis*. J Cell Biol, 1993. **122**(3): p. 565-78.
109. Lieberman, D.N. and I. Mody, *Regulation of NMDA channel function by endogenous Ca(2+)-dependent phosphatase*. Nature, 1994. **369**(6477): p. 235-9.
110. Sugimoto, T., S. Stewart, and K.L. Guan, *The calcium/calmodulin-dependent protein phosphatase calcineurin is the major Elk-1 phosphatase*. J Biol Chem, 1997. **272**(47): p. 29415-8.
111. Das, A.K., et al., *Crystal structure of the protein serine/threonine phosphatase 2C at 2.0 Å resolution*. Embo J, 1996. **15**(24): p. 6798-809.
112. Shenolikar, S., *Protein serine/threonine phosphatases--new avenues for cell regulation*. Annu Rev Cell Biol, 1994. **10**: p. 55-86.
113. Ingebritsen, T.S., A.A. Stewart, and P. Cohen, *The protein phosphatases involved in cellular regulation. 6. Measurement of type-1 and type-2 protein phosphatases in extracts of mammalian tissues; an assessment of their physiological roles*. Eur J Biochem, 1983. **132**(2): p. 297-307.
114. McGowan, C.H. and P. Cohen, *Identification of two isoenzymes of protein phosphatase 2C in both rabbit skeletal muscle and liver*. Eur J Biochem, 1987. **166**(3): p. 713-21.
115. Tamura, S., et al., *Molecular cloning of rat type 2C (IA) protein phosphatase mRNA*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1989. **86**(6): p. 1796-800.
116. Wenk, J., et al., *Molecular cloning and primary structure of a protein phosphatase 2C isoform*. FEBS Lett, 1992. **297**(1-2): p. 135-8.
117. Saadat, M. and K. Kikuchi, *Assignment of the gene encoding magnesium-dependent protein phosphatase 1alpha (PPM1A) to human chromosome 14q22-->q23 and rat chromosome 6q24 by fluorescence in situ hybridization*. Cytogenet Genome Res, 2005. **108**(4): p. 363.
118. Lifschitz-Mercer, B., et al., *Protein phosphatase 2Calpha expression in normal human tissues: an immunohistochemical study*. Histochem Cell Biol, 2001. **116**(1): p. 31-9.
119. Wu, S.K., et al., *Expression of PTEN, PPM1A and P-Smad2 in hepatocellular carcinomas and adjacent liver tissues*. World J Gastroenterol, 2007. **13**(34): p. 4554-9.

120. Bu, S., et al., *Opposite effects of dihydrosphingosine 1-phosphate and sphingosine 1-phosphate on transforming growth factor-beta/Smad signaling are mediated through the PTEN/PPM1A-dependent pathway*. J Biol Chem, 2008. **283**(28): p. 19593-602.
121. Lee, J.E., J.S. Lee, and S.H. Hwang, *Microarray for genes associated with signal transduction in diabetic OLETF keratocytes*. Korean J Ophthalmol, 2007. **21**(2): p. 111-9.
122. Fjeld, C.C. and J.M. Denu, *Kinetic analysis of human serine/threonine protein phosphatase 2C α* . J Biol Chem, 1999. **274**(29): p. 20336-43.
123. Jackson, M.D., C.C. Fjeld, and J.M. Denu, *Probing the function of conserved residues in the serine/threonine phosphatase PP2C α* . Biochemistry, 2003. **42**(28): p. 8513-21.
124. Cheng, A., P. Kaldis, and M.J. Solomon, *Dephosphorylation of human cyclin-dependent kinases by protein phosphatase type 2C α and β 2 isoforms*. J Biol Chem, 2000. **275**(44): p. 34744-9.
125. Kobayashi, T., et al., *Isoform specific phosphorylation of protein phosphatase 2C expressed in COS7 cells*. FEBS Lett, 1998. **430**(3): p. 222-6.
126. Davies, S.P., et al., *5'-AMP inhibits dephosphorylation, as well as promoting phosphorylation, of the AMP-activated protein kinase. Studies using bacterially expressed human protein phosphatase-2C α and native bovine protein phosphatase-2AC*. FEBS Lett, 1995. **377**(3): p. 421-5.
127. Hardie, D.G., et al., *AMP-activated protein kinase: an ultrasensitive system for monitoring cellular energy charge*. Biochem J, 1999. **338** (Pt 3): p. 717-22.
128. Hardie, D.G., et al., *Management of cellular energy by the AMP-activated protein kinase system*. FEBS Lett, 2003. **546**(1): p. 113-20.
129. Horman, S., et al., *Activation of AMP-activated protein kinase leads to the phosphorylation of elongation factor 2 and an inhibition of protein synthesis*. Curr Biol, 2002. **12**(16): p. 1419-23.
130. Inoki, K., T. Zhu, and K.L. Guan, *TSC2 mediates cellular energy response to control cell growth and survival*. Cell, 2003. **115**(5): p. 577-90.
131. Barnes, K., et al., *Activation of GLUT1 by metabolic and osmotic stress: potential involvement of AMP-activated protein kinase (AMPK)*. J Cell Sci, 2002. **115**(Pt 11): p. 2433-42.
132. Merrill, G.F., et al., *AICA riboside increases AMP-activated protein kinase, fatty acid oxidation, and glucose uptake in rat muscle*. Am J Physiol, 1997. **273**(6 Pt 1): p. E1107-12.
133. Garton, A.J. and S.J. Yeaman, *Identification and role of the basal phosphorylation site on hormone-sensitive lipase*. Eur J Biochem, 1990. **191**(1): p. 245-50.
134. Yeaman, S.J., et al., *The multifunctional role of hormone-sensitive lipase in lipid metabolism*. Adv Enzyme Regul, 1994. **34**: p. 355-70.
135. Fukunaga, K., et al., *Dephosphorylation of autophosphorylated Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II by protein phosphatase 2C*. J Biol Chem, 1993. **268**(1): p. 133-7.
136. Ingebritsen, T.S. and P. Cohen, *The protein phosphatases involved in cellular regulation. I. Classification and substrate specificities*. Eur J Biochem, 1983. **132**(2): p. 255-61.
137. Malumbres, M. and M. Barbacid, *Mammalian cyclin-dependent kinases*. Trends Biochem Sci, 2005. **30**(11): p. 630-41.

138. Ofek, P., et al., *Cell cycle regulation and p53 activation by protein phosphatase 2C alpha*. J Biol Chem, 2003. **278**(16): p. 14299-305.
139. Kitada, S., et al., *Expression and location of pro-apoptotic Bcl-2 family protein BAD in normal human tissues and tumor cell lines*. Am J Pathol, 1998. **152**(1): p. 51-61.
140. Klumpp, S., et al., *Protein kinase CK2 phosphorylates BAD at threonine-117*. Neurochem Int, 2004. **45**(5): p. 747-52.
141. Massague, J., J. Seoane, and D. Wotton, *Smad transcription factors*. Genes Dev, 2005. **19**(23): p. 2783-810.
142. Duan, X., et al., *Protein serine/threonine phosphatase PPM1A dephosphorylates Smad1 in the bone morphogenetic protein signaling pathway*. J Biol Chem, 2006. **281**(48): p. 36526-32.
143. Lin, X., et al., *PPM1A functions as a Smad phosphatase to terminate TGFbeta signaling*. Cell, 2006. **125**(5): p. 915-28.
144. Hanada, M., et al., *Selective suppression of stress-activated protein kinase pathway by protein phosphatase 2C in mammalian cells*. FEBS Lett, 1998. **437**(3): p. 172-6.
145. Takekawa, M., T. Maeda, and H. Saito, *Protein phosphatase 2Calpha inhibits the human stress-responsive p38 and JNK MAPK pathways*. EMBO J, 1998. **17**(16): p. 4744-52.
146. Tamura, S., et al., *PP2C family members play key roles in regulation of cell survival and apoptosis*. Cancer Sci, 2006. **97**(7): p. 563-7.
147. Yoshizaki, T., et al., *Protein phosphatase-2C alpha as a positive regulator of insulin sensitivity through direct activation of phosphatidylinositol 3-kinase in 3T3-L1 adipocytes*. J Biol Chem, 2004. **279**(21): p. 22715-26.
148. Desdouits, F., et al., *Dephosphorylation of Ser-137 in DARPP-32 by protein phosphatases 2A and 2C: different roles in vitro and in striatonigral neurons*. Biochem J, 1998. **330** (Pt 1): p. 211-6.
149. Flajolet, M., et al., *Protein phosphatase 2C binds selectively to and dephosphorylates metabotropic glutamate receptor 3*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(26): p. 16006-11.
150. Li, D., et al., *A protein phosphatase 2calpha-Ca2+ channel complex for dephosphorylation of neuronal Ca2+ channels phosphorylated by protein kinase C*. J Neurosci, 2005. **25**(8): p. 1914-23.
151. Luo, W. and S.C. Lin, *Axin: a master scaffold for multiple signaling pathways*. Neurosignals, 2004. **13**(3): p. 99-113.
152. Strovel, E.T., D. Wu, and D.J. Sussman, *Protein phosphatase 2Calpha dephosphorylates axin and activates LEF-1-dependent transcription*. J Biol Chem, 2000. **275**(4): p. 2399-403.
153. Hishiya, A., et al., *Protein phosphatase 2C inactivates F-actin binding of human platelet moesin*. J Biol Chem, 1999. **274**(38): p. 26705-12.
154. Kemp, A. and A.J. Van Heijningen, *A colorimetric micro-method for the determination of glycogen in tissues*. Biochem J, 1954. **56**(4): p. 646-8.
155. *Body weight information from strain 000664*. [cited 2010; Available from: <http://jaxmice.jax.org/support/weight/000664.html>].
156. Greenfield, J.R. and L.V. Campbell, *Insulin resistance and obesity*. Clin Dermatol, 2004. **22**(4): p. 289-95.
157. Gallou-Kabani, C., et al., *C57BL/6J and A/J mice fed a high-fat diet delineate components of metabolic syndrome*. Obesity (Silver Spring), 2007. **15**(8): p. 1996-2005.

158. Rayasam, G.V., et al., *Glycogen synthase kinase 3: more than a namesake*. Br J Pharmacol, 2009. **156**(6): p. 885-98.
159. Roseboom, P.H., et al., *Natural melatonin 'knockdown' in C57BL/6J mice: rare mechanism truncates serotonin N-acetyltransferase*. Brain Res Mol Brain Res, 1998. **63**(1): p. 189-97.
160. Shieh, J.M., et al., *Melatonin ameliorates high fat diet-induced diabetes and stimulates glycogen synthesis via a PKCzeta-Akt-GSK3beta pathway in hepatic cells*. J Pineal Res, 2009. **47**(4): p. 339-44.
161. Voet, D. and J.G. Voet, *Biochemistry, Second Edition*. 2 ed. Vol. 1. 1998: John Wiley & Sons, Inc. 1361.
162. Hussain, M.M., J. Shi, and P. Dreizen, *Microsomal triglyceride transfer protein and its role in apoB-lipoprotein assembly*. J Lipid Res, 2003. **44**(1): p. 22-32.
163. Lin, M.C., D. Gordon, and J.R. Wetterau, *Microsomal triglyceride transfer protein (MTP) regulation in HepG2 cells: insulin negatively regulates MTP gene expression*. J Lipid Res, 1995. **36**(5): p. 1073-81.
164. Tabbi-Annani, I., et al., *Overexpression of nuclear receptor SHP in adipose tissues affects diet-induced obesity and adaptive thermogenesis*. Am J Physiol Endocrinol Metab.
165. Hunt, C.R., et al., *Adipocyte P2 gene: developmental expression and homology of 5'-flanking sequences among fat cell-specific genes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1986. **83**(11): p. 3786-90.

