

Université de Montréal

Rôle de la protéine adaptatrice APS  
dans les voies de signalisation du récepteur  $\beta$  du PDGF

par  
Martine Bail

Département de biochimie  
Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures  
en vue de l'obtention du grade de M.Sc.  
en biochimie

Août 2004

© Martine Bail, 2004





## **AVIS**

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

## **NOTICE**

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

Rôle de la protéine adaptatrice APS  
dans les voies de signalisation du récepteur  $\beta$  du PDGF

présenté par :

Martine Bail

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Sylvie Mader  
président-rapporteur

Dr Mounib Elchebly  
directeur de recherche

Dr Nikolaus Heveker  
membre du jury

## Résumé

APS (adaptor protein with PH and SH2 domains) est une protéine adaptatrice dont la fonction a surtout été étudiée dans les voies de signalisation du récepteur de l'insuline. La fonction d'APS dans les voies des nombreux autres récepteurs transmembranaires dont elle est aussi un substrat est encore peu étudiée. Nous avons voulu caractériser davantage le rôle d'APS dans les voies du récepteur  $\beta$  du PDGF. Pour ce faire, nous avons utilisé une approche de transfection transitoire de fibroblastes 293.T suivie d'analyses d'interactions protéiques et d'états de phosphorylation sur tyrosine par immunoprécipitation et immunobuvardages Western. Nos résultats suggèrent fortement que le domaine SH2 d'APS est essentiel à son association avec le PDGFR $\beta$  et à sa phosphorylation sur tyrosine à la suite de l'activation du récepteur. Aussi, nos résultats démontrent que la tyrosine 546 d'APS est un site principal de phosphorylation sur tyrosine conséquemment à l'activation du PDGFR $\beta$ . Nous identifions ainsi un nouveau site de phosphorylation sur tyrosine d'APS. En outre, nos résultats démontrent que la co-expression d'APS conduit à la diminution de l'association de la sous-unité régulatrice p85 $\alpha$  de la PI3K avec le PDGFR $\beta$ , de la phosphorylation sur tyrosine de p85 $\alpha$  à la suite de l'activation du PDGFR $\beta$  et de l'association de la protéine tyrosine phosphatase SHP-2 avec p85 $\alpha$  dans les voies du PDGFR $\beta$ . Nous identifions ainsi une nouvelle interaction protéique, entre SHP-2 et p85 $\alpha$ , dans les voies du PDGFR $\beta$ . De façon importante, ces résultats appuient fortement l'hypothèse que l'expression d'APS diminue l'activation de la PI3K dans les voies du PDGFR $\beta$ .

### Mots clefs :

tyrosine kinase, sous-unité régulatrice p85, phosphatidylinositol-3'-kinase (PI3K), SHP-2, phosphorylation sur tyrosine, domaine SH2, interaction protéique, oligomérisation, modification post-traductionnelle

## Abstract

APS (adaptor protein with PH and SH2 domains) is an adaptor protein whose functions were above all studied in the insulin receptor signalling pathways. The function of APS in the numerous other transmembrane receptors pathways where APS is a substrate is to date hardly studied. Therefore, we wanted to characterize more the role of APS in PDGF receptor  $\beta$  pathways. To do that, we used transitory transfections of 293.T fibroblasts and analysed protein-protein interactions and tyrosine phosphorylation states with immunoprecipitations and Western blots. Our results strongly suggest that the SH2 domain of APS is required for its association with PDGFR $\beta$  and for its tyrosine phosphorylation following PDGFR $\beta$  activation. Also, our results demonstrate that APS is mainly tyrosine phosphorylated, following PDGFR $\beta$  activation, on the tyrosine 546. Thus, we have identified a new tyrosine phosphorylation site of APS. Moreover, our results show that the co-expression of APS leads to a decrease in the association of the p85 $\alpha$  regulatory subunit of PI3K with PDGFR $\beta$ , in p85 $\alpha$  tyrosine phosphorylation following PDGFR $\beta$  activation and in the association of SHP-2 with p85 $\alpha$  in PDGFR $\beta$  signalling pathways. In this way, we are identifying a new protein-protein interaction, between SHP-2 and p85 $\alpha$ , in PDGFR $\beta$  signalling pathways. Importantly, our results strongly support the hypothesis that co-expression of APS negatively modulates PI3K activation in PDGFR $\beta$  signalling pathways.

### Keywords:

tyrosine kinase, p85 regulatory subunit, phosphatidylinositol-3'-kinase (PI3K), SHP-2, tyrosine phosphorylation, SH2 domain, protein-protein interaction, oligomerisation, post-traductional modification

## Table des matières

<b>Résumé</b> .....	<b>i</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>ii</b>
<b>Liste des figures</b> .....	<b>v</b>
<b>Liste des tableaux</b> .....	<b>vi</b>
<b>Liste des sigles et abréviations</b> .....	<b>vii</b>
<b>Remerciements</b> .....	<b>xi</b>
<b>1. Introduction</b> .....	<b>1</b>
Préambule.....	2
APS : protéine adaptatrice contenant un domaine PH et un domaine SH2 .....	2
Clonage .....	2
Structure, domaines et déterminants d'interaction moléculaire d'APS .....	3
Caractéristiques du domaine SH2 d'APS .....	4
Conservation d'APS chez la souris, le rat et l'humain.....	5
Définition d'une nouvelle famille de protéines adaptatrices .....	5
Expression cellulaire et tissulaire d'APS .....	7
Fonction d'APS dans les voies de signalisation du récepteur de l'insuline.....	7
Association directe du domaine SH2 d'APS au domaine tyrosine kinase de l'IR.....	7
Protection contre la déphosphorylation des tyrosines de la boucle d'activation de l'IR par APS.....	8
Rôle essentiel d'APS en tant que protéine adaptatrice dans la phosphorylation de Cbl par le IR.....	8
Augmentation de la sensibilité à l'insuline et hypoinsulinémie chez les souris <i>APS<sup>-/-</sup></i> .....	9
Implication d'APS dans de nombreuses autres voies de signalisation .....	10
Fonctions des autres membres de la famille .....	12
Lnk.....	12
SH2-B .....	12
Le PDGF et ses récepteurs .....	14
Les isoformes du PDGF .....	14
Les récepteurs du PDGF.....	15
Structure du PDGFR .....	15
Synthèse et maturation du PDGFR.....	17
Dynamique cellulaire du PDGFR .....	17
Signalisation intracellulaire par le PDGFR.....	17
Fonction physiologique du PDGF.....	20
Fonction normale du PDGF et de ses récepteurs.....	20
Pathologies impliquant le PDGF et ses récepteurs .....	21
La phosphatidylinositol-3'-kinase (PI3K).....	23
Introduction.....	23
La PI3K dans les voies du PDGF .....	24

SHP-2 : protéine tyrosine phosphatase possédant deux domaines SH2 .....	25
Introduction.....	25
SHP-2 dans les voies du PDGFR $\beta$ .....	27
Relation entre la PI3K et SHP-2 .....	28
Objectifs .....	29
<b>2. Matériel et méthodes .....</b>	<b>30</b>
Plasmides d'expression eucaryote utilisés .....	31
Mutagenèse dirigée .....	32
Obtention d'un anticorps polyclonal de lapin anti-APS .....	34
Culture cellulaire .....	34
Transfections transitoires et stimulation par le PDGF-BB des 293.T .....	35
Préparation des extraits cellulaires totaux et immunoprécipitations .....	36
Analyse des ECT et des IP par immunobuvardage Western .....	37
GST-SH2 pull down .....	39
<b>3. Description et analyse des résultats .....</b>	<b>40</b>
L'utilisation du sérum 17B6 pour les immunoprécipitations d'APS est valide .....	41
Myc-APS est un substrat du PDGFR $\beta$ .....	44
La tyrosine 763 du PDGFR $\beta$ recrute Myc-APS <i>in vivo</i> , mais n'est pas essentielle à la phosphorylation sur tyrosine de Myc-APS .....	49
Le domaine SH2 de Myc-APS est essentiel à son association au PDGFR $\beta$ et à sa phosphorylation, principalement sur la tyrosine 546.....	51
Le tryptophane 483 du domaine SH2 d'APS n'est pas essentiel à son oligomérisation <i>in vivo</i> .....	57
Myc-APS interagit <i>in vitro</i> avec les domaines SH2 de la sous-unité régulatrice p85 $\alpha$ de la PI3K .....	59
La co-expression de Myc-APS diminue la phosphorylation sur tyrosine de Flag-p85 $\alpha$ et son association avec le PDGFR $\beta$ activé .....	61
La co-expression de Myc-APS diminue la co-immunoprécipitation de SHP-2 avec Flag-p85 $\alpha$ dans les voies du PDGFR $\beta$ .....	62
Myc-APS ne modifie pas la phosphorylation sur tyrosine de SHP-2 dans les voies du PDGFR $\beta$ .....	65
L'expression de Myc-APS permet la détection, à la suite de l'activation du PDGFR $\beta$ , d'une phosphoprotéine de 95 kDa co-immunoprécipitant avec SHP-2.....	66
<b>4. Discussion.....</b>	<b>68</b>
<b>5. Conclusion .....</b>	<b>85</b>
<b>Bibliographie.....</b>	<b>88</b>

## Liste des figures

Figure 1	Schéma linéaire de la structure d'APS d'origine humaine représentant ses domaines et autres déterminants d'interaction moléculaire.....	4
Figure 2	Comparaison de la structure et des déterminants d'interaction moléculaire de hAPS avec hLnk et hSH2-B $\alpha$ .....	6
Figure 3	Structure des PDGFR $\alpha$ et PDGFR $\beta$ et identité des dimères de ceux-ci pouvant être induits à la suite de la liaison du PDGF-AA, -AB ou -BB .....	16
Figure 4	Localisation des sites d'autophosphorylation du PDGFR $\beta$ impliqués dans l'activation du récepteur et dans le recrutement d'APS, de la PI3K et de SHP-2.....	20
Figure 5	Protocole d'immunisation de lapin .....	35
Figure 6	L'utilisation du sérum 17B6 pour l'immunoprécipitation d'APS est valide.....	43
Figure 7	Myc-APS est un substrat du PDGFR $\beta$ .....	46
Figure 8	L'utilisation de l'anticorps anti-Myc 9E10 ou du sérum 17B6 ne change pas la diminution du rendement d'immunoprécipitation de Myc-APS à partir de cellules stimulées par le PDGF-BB. ....	48
Figure 9	La tyrosine 763 du PDGFR $\beta$ est un site de recrutement <i>in vivo</i> de Myc-APS. ....	50
Figure 10	Le domaine SH2 de Myc-APS est essentiel, <i>in vivo</i> , à son association avec le PDGFR $\beta$ ainsi qu'à sa phosphorylation sur tyrosine, principalement sur la tyrosine 546. ....	56
Figure 11	Le tryptophane 483 du domaine SH2 d'APS n'est pas essentiel à son oligomérisation <i>in vivo</i> .....	58
Figure 12	Myc-APS hyperphosphorylée interagit <i>in vitro</i> avec les domaines SH2 N- et C-terminaux de p85 $\alpha$ . ....	60
Figure 13	La co-expression de Myc-APS diminue la phosphorylation sur tyrosine de Flag-p85 $\alpha$ par le PDGFR $\beta$ et la co-immunoprécipitation du récepteur avec Flag-p85 $\alpha$ .....	63
Figure 14	La co-expression de Myc-APS diminue la co-immunoprécipitation de SHP-2 avec Flag-p85 $\alpha$ . ....	64
Figure 15	L'expression de Myc-APS ne diminue pas la phosphorylation sur tyrosine de SHP-2 à la suite de l'activation du PDGFR $\beta$ .....	67

## Liste des tableaux

Tableau I	Amorces complémentaires utilisées pour la correction des mutations D48V et L342P d'APS par mutagenèse dirigée.....	32
Tableau II	Amorces complémentaires utilisées pour la production des mutants d'APS et du PDGFR $\beta$ par mutagenèse dirigée.....	33

## Liste des sigles et abréviations

6xHis	étiquette de six histidines
$\alpha$ -	anti-
ADN	acide désoxyribonucléique
ADNc	ADN complémentaire
APS	Adaptor protein with PH and SH2 domain
ARN	acide ribonucléique
ARNm	ARN messenger
Asb	ankyrin and SOCS box
Bad	Bcl2-antagonist of cell death
BRET	bioluminescence resonance energy transfer
BSA	bovine serum albumin
CAP	Cbl-associated protein
c-Kit	cellular Kit
CRSNG	Conseil de recherches en sciences naturelles et en génie du Canada
CSF-1	colony stimulating factor 1
CSF-1R	CSF-1 receptor
C-SH2	C-terminal SH2 domain
Ct	C-terminal
DMEM	Dulbecco's modified Eagle medium
DMSO	dimethyl sulfoxide
ECT	extrait cellulaire total
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
EGF	epidermal growth factor
EGFR	EGF receptor
EGTA	ethylene glycol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid
Endo H	endo- $\beta$ -N-acétylglucosaminidase H
EPO	érythropoïétine
ERK	extracellular signal-regulated kinase
FAK	focal adhesion kinase
FBS	fetal bovine serum

FcεRI	Fc of ε heavy chain receptor I
FGFR3	fibroblast growth factor receptor 3
FRET	fluorescence resonance energy transfer
Gab	Grb2-associated binding protein
GAP	GTPase-activating protein
GEF	guanine nucleotide exchange factor
GH	growth hormone
Glut4	glucose transporter 4
GM-CSF	granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
Grb2	growth factor receptor-bound protein 2
GSK-3β	glycogen synthase kinase-3β
GST	glutathion S-transférase
GTPase	guanosine triphosphatase
HeBS	HEPES-buffered saline
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)piperazine-N'-(2-ethanesulfonic acid), 4-(2-Hydroxy-ethyl)piperazine-1-ethanesulfonic acid
HNMETG	HEPES, NaCl, MgCl <sub>2</sub> , EGTA, triton X-100, glycérol
HRP	horseradish peroxidase
IB	immunobuvardage
IgA	immunoglobuline de classe A
IgE	immunoglobuline de classe E
IGF-I, -II	insulin-like growth factor I, II
IGF-IR	IGF-I receptor
IK	insert du domaine kinase
IL-2, -3	interleukine 2, 3
INF-γ	interféron gamma
IP	immunoprécipitation
IPTG	isopropylβ-D-1-thiogalactopyranoside
IR	insulin receptor
IRK	insulin receptor kinase domain
IRS-1	insulin receptor substrate-1
JAK	Janus kinase
JM	juxtamembranaire
ko	knockout

LBA	milieu Luria-Bertani avec 100 µg/mL d'ampicilline
LIF	leukemia inhibitory factor
MAPK	mitogen activated protein kinase
MEK	MAPK/ERK kinase
NF-AT	nuclear factor of activated T-cells
NGF	nerve growth factor
NP-40	nonidet <sup>®</sup> P 40
N-SH2	N-terminal SH2 domain
p85 $\alpha$	sous-unité régulatrice p85 $\alpha$ de la PI3K
PBS	phosphate-buffered saline
PBS-T	PBS-Tween 20
PCR	polymerase chain reaction
PDGF	platelet-derived growth factor
PDGFR	PDGF receptor
PDGFR $\alpha$ , $\beta$	PDGF receptor $\alpha$ , $\beta$
PDK1	3'-phosphatidylinositol-dependent kinase 1
PH	Pleckstrin homology
PI3K	phosphatidylinositol-3'-kinase
PI(4,5)P <sub>2</sub>	phosphatidylinositol-4,5-biphosphate
PI(3,4,5)P <sub>3</sub>	phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate
PLC $\gamma$	phospholipase C gamma
PMSF	phenylmethanesulfonyl fluoride
pp95	phosphoprotéine de 95 kDa
PTK	protéine tyrosine kinase
PTP	protéine tyrosine phosphatase
PVDF	polyvinylidene Difluoride
pY	phosphotyrosine
RE	réticulum endoplasmique
RIPA	radio-immunoprecipitation assay
RTK	récepteur à activité tyrosine kinase
S6 kinase	ribosomal protein S6 kinase
SDS	sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE	SDS-polyacrylamide gel electrophoresis
SDS-SB	SDS-sample buffer

SH2	Src homology 2
SH3	Src homology 3
SHP-2	SH2 domain-containing protein tyrosine phosphatase-2
SOCS	suppressor of cytokine signalling
STAT	signal transducers and activators of transcription
TCR	T-cell antigen receptor
TK	tyrosine kinase
TNE	Tris, NaCl, EDTA
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethane
v-Akt	viral Akt
VSMC	vascular smooth muscle cells
v-Src	viral Src
wt	wild-type

## Remerciements

Merci à mon directeur de recherche, Mounib Elchebly, pour ses suggestions et sa très grande disponibilité.

Merci au CRSNG et à la Fondation de l'hôpital Sainte-Justine pour le support financier.

Merci à Jean pour son soutien, sa présence, sa compréhension et son sens aigu de la réalité. Merci à mes parents pour leur dévouement et leur support.

Merci à mes collègues et amies Mélanie Sanchez, Catherine Charbonneau, Véronique Saint-Laurent, Amélie Rodrigue-Way, Julie Lepage et Annie Demers, pour leur écoute, leur présence, leur support... Ainsi que pour la complicité et les rires partagés ! Un merci tout spécial à Amélie pour le partage si généreux de son expérience professionnelle.

## **1. Introduction**

## ***Préambule***

Plusieurs voies de signalisation sont soumises à une régulation par la phosphorylation sur tyrosine de leurs protéines. La phosphorylation sur tyrosine d'une protéine peut en altérer l'activité enzymatique, la localisation cellulaire et/ou son assemblage en complexes de signalisation, contrôlant ainsi des événements en aval dans les voies de signalisation. Les enzymes impliquées dans ces voies sont les protéines tyrosines kinases (PTK), qui catalysent la phosphorylation des tyrosines, et les protéines tyrosines phosphatases (PTP), qui en effectuent la déphosphorylation (1). D'autres protéines, dépourvues d'activités enzymatiques, participent aussi à la régulation de ces voies de signalisation. Ces protéines adaptatrices, constituées uniquement de domaines d'interaction moléculaire, servent d'échafaudage à l'assemblage de complexes de signalisation. Par exemple, une protéine adaptatrice possédant un domaine SH2 en combinaison avec d'autres déterminants d'interaction moléculaire peut induire le recrutement et l'assemblage de plusieurs protéines à une seule phosphotyrosine présente, par exemple, sur un récepteur tyrosine kinase (RTK) activé. Le complexe de signalisation ainsi formé à l'aide de la protéine adaptatrice pourra alors activer une ou plusieurs voies de signalisation (2).

## ***APS : protéine adaptatrice contenant un domaine PH et un domaine SH2***

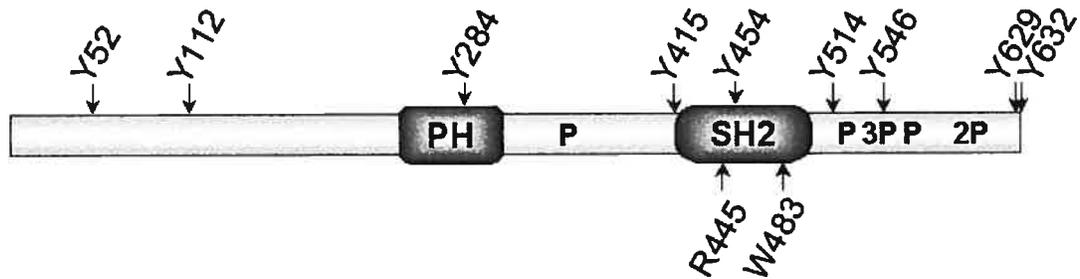
### *Clonage*

APS a été identifiée la première fois par sa capacité à interagir avec le RTK c-Kit. Un criblage par double hybride chez la levure, avec le domaine tyrosine kinase oncogénique de c-Kit (D816V) comme appât, a permis d'isoler un nouvel ADNc à partir d'une banque provenant de cellules B humaines (3). La protéine ainsi isolée était phosphorylée sur tyrosine à la suite de la stimulation du récepteur c-Kit. De plus, elle co-immunoprécipitait avec c-Kit. Ces résultats ont confirmé qu'une nouvelle protéine, APS, venait d'être identifiée et que cette protéine est un substrat direct de c-Kit.

### Structure, domaines et déterminants d'interaction moléculaire d'APS

APS a été baptisée en fonction de sa structure (**Figure 1**). Tout d'abord, l'analyse de sa séquence a montré l'absence de domaine enzymatique, la classant de ce fait parmi les protéines adaptatrices. L'analyse de sa séquence a révélé la présence d'un domaine PH (pleckstrin homology) ainsi que d'un domaine SH2 (Src homology 2). Elle a donc été nommée « adaptor protein with PH and SH2 domains », ou APS (3). Les domaines PH ont la capacité de lier les phosphoinositols membranaires, permettant des interactions protéine-membrane plasmatique (4). Les domaines SH2, pour leur part, interviennent dans des interactions protéine-protéine en liant les phosphotyrosines présentes sur diverses protéines cellulaires à la suite de l'activation de PTK par des signaux extracellulaires (5). Chez l'humain, APS possède de plus neuf tyrosines, sites potentiels de phosphorylation et donc de recrutement de protéines possédant un domaine SH2. Huit motifs riches en proline (PxxP) correspondant au consensus de liaison des domaines SH3 (Src homology 3) sont aussi répartis entre son domaine PH et son domaine SH2 ainsi que dans sa queue C-terminale (6). Son domaine N-terminal ne possède pas de consensus connu.

Aucune fonction n'a été rapportée concernant ses motifs riches en proline. La seule information disponible concernant son domaine N-terminal est qu'il est nécessaire à l'inhibition de l'activité transcriptionnelle de STAT5 par APS dans les voies du récepteur de l'érythropoïétine (7). De toutes ses tyrosines, la seule ayant été formellement identifiée comme étant la cible de PTK est la tyrosine 629. Cette tyrosine est le site de phosphorylation d'APS par le récepteur de l'insuline (8). Il a été rapporté qu'à la suite de sa phosphorylation, la tyrosine 629 permet l'association du domaine SH2 de Cbl (9,10). Il a aussi été rapporté que l'activation de c-Kit et de JAK2 conduit à la phosphorylation sur tyrosine d'APS dans la queue C-terminale (3,11). Le domaine SH2 d'APS, pour sa part, permet l'association directe d'APS au récepteur de l'insuline et au récepteur c-Kit (3,8,12,13). Enfin, il a été rapporté que son domaine PH lui permet de s'associer au proto-oncogène Vav3 pour en moduler l'activité (14).



**Figure 1 Schéma linéaire de la structure d'APS d'origine humaine représentant ses domaines et autres déterminants d'interaction moléculaire**

Schéma linéaire des 632 acides aminés de la protéine adaptatrice APS d'origine humaine. La localisation des domaines PH et SH2 d'APS est indiquée. Les motifs riches en proline correspondant au consensus de reconnaissance par les domaines SH3 (PxxP) sont identifiés par un "P" majuscule dans la structure. Lorsque les motifs riches en proline se chevauchent, le nombre de motifs dans la répétition est indiqué. En tant que sites potentiels de phosphorylation et d'interaction avec des domaines SH2, la position des neuf tyrosines d'APS est indiquée par une flèche au-dessus de la structure. De plus, l'arginine conservée de la poche de liaison des phosphotyrosines de son domaine SH2 ainsi que le tryptophane impliqué dans la dimérisation de son domaine SH2 sont aussi indiqués par une flèche, sous la structure.

#### *Caractéristiques du domaine SH2 d'APS*

Il a été proposé par des études de liaison à des peptides contenant une phosphotyrosine que la liaison du domaine SH2 d'APS dépend de la présence d'une leucine ou d'une isoleucine en position +3 de la phosphotyrosine (pYXX<sup>I/L</sup>) (15). Les tyrosines de c-Kit et du PDGFR $\beta$  recrutant APS correspondent à ce consensus. Cependant, ce consensus ne semble pas essentiel à la liaison du domaine SH2 d'APS, puisque parmi toutes les tyrosines de RTK identifiées à ce jour comme recrutant APS, certaines n'y correspondent pas. C'est le cas, notamment, du récepteur de l'insuline (IR), dont les tyrosines s'associant au domaine SH2 d'APS ont pourtant été confirmées hors de tout doute par cristallographie à rayon X

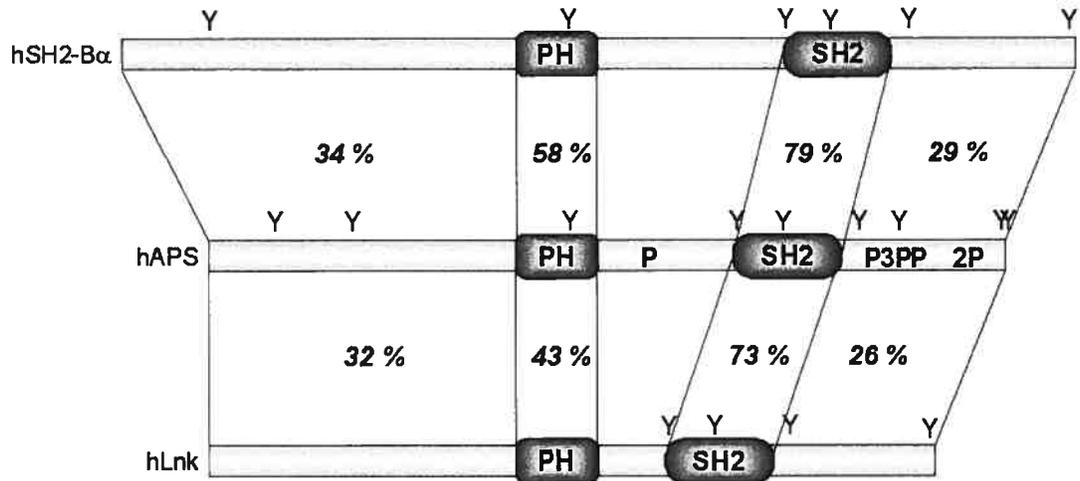
(13). Une cristallographie par rayons X a révélé que le domaine SH2 d'APS est dimérique. Il a été montré que le résidu critique à cette dimérisation est un tryptophane conservé entre les espèces, le W475 d'APS chez le rat. Sa mutation en histidine (résidu hydrophobe vers résidu hydrophile) empêche la dimérisation du domaine SH2 d'APS. La surface de dimérisation, l'hélice  $\alpha$  C-terminale, est opposée à la poche de liaison des phosphotyrosines, située dans la moitié N-terminale du domaine SH2. Il a été montré, par la co-cristallisation du domaine SH2 d'APS avec le domaine tyrosine kinase de l'IR (IRK), que chaque domaine SH2 d'APS peut ainsi s'associer avec un IRK dans le dimère de l'IR. L'importance fonctionnelle de cette dimérisation n'a pas été étudiée. Il a été confirmé, *in vivo*, que le domaine SH2 d'APS permet son oligomérisation constitutive (13). Ce résultat explique l'observation initiale de Yokouchi qui a montré qu'APS s'associe à une protéine de fusion GST-domaine SH2 d'APS (3).

#### Conservation d'APS chez la souris, le rat et l'humain

APS est conservée entre les espèces. APS d'origine humaine (h) possède 82% d'identité avec APS d'origine murine (m) et APS de rat (r). Plus précisément, le domaine PH et le domaine SH2 de hAPS ont respectivement 100% et 97% d'identité en acides aminés lorsque comparés à ces domaines de mAPS et de rAPS. Toutes les tyrosines de hAPS, à l'exception de la tyrosine 454, sont conservées chez la souris et le rat. De plus, les motifs riches en proline situés entre le domaine PH et le domaine SH2 ainsi que le premier, le cinquième et le septième motif de la queue C-terminale de hAPS sont présents dans mAPS et rAPS.

#### Définition d'une nouvelle famille de protéines adaptatrices

Lors de l'identification d'APS, une recherche par homologie de séquence des acides aminés d'APS a permis de définir une nouvelle famille de protéines adaptatrices dont les autres membres sont SH2-B et Lnk (**Figure 2**). Les membres de cette famille possèdent tous un domaine PH et un domaine SH2, présentant un pourcentage d'identité d'acides aminés élevés. De plus, tous les membres de la famille possèdent plusieurs tyrosines. Les tyrosines 415, 454, 546 et 629 de hAPS sont conservées entre tous les membres humains de la famille.



**Figure 2 Comparaison de la structure et des déterminants d'interaction moléculaire de hAPS avec hLnk et hSH2-B $\alpha$**

Les pourcentages d'identité en acides aminés entre le domaine N-terminal, le domaine PH, le domaine SH2 et la queue C-terminal de hAPS et ceux de hLnk et de hSH2-B $\alpha$  sont indiqués. Le segment entre les domaines PH et SH2 n'a pas de similarité significative entre les membres de la famille. Les tyrosines de hLnk et de hSH2-B $\alpha$  qui sont conservées chez hAPS sont indiquées. Les motifs riches en proline de hAPS ne sont pas conservés chez les autres membres de la famille. Cependant, hSH2-B $\alpha$  contient elle aussi des motifs riches en proline, à savoir trois entre son domaine PH et son domaine SH2 ainsi que cinq dans sa queue C-terminale.

### Expression cellulaire et tissulaire d'APS

L'ARN messager d'APS a été détecté dans plusieurs tissus, dont la prostate, les testicules, l'utérus, le placenta, l'intestin grêle, le rein, le cœur, les poumons et le cerveau (3,8,9,11). Il a aussi été détecté dans les tissus cibles de l'insuline, soit dans le muscle squelettique, le pancréas, le foie et le tissu adipeux (3,8,9). Dans les tissus hématopoïétiques, son ARNm est retrouvé dans les leucocytes périphériques, les lymphocytes B, dans la moelle osseuse et dans la rate (3,8,11). Dans la rate, son ARNm est retrouvé dans les cellules B et non dans les cellules T, ce qui est en accord avec son absence dans le thymus (11). Au niveau des lignées cellulaires, l'ARNm d'APS est détecté dans les fibroblastes NIH 3T3 ainsi que dans plusieurs lignées de cellules B, par exemple BAL17, BCL1, Daudi et Raji (3,11,16).

Il a été confirmé que la protéine est exprimée dans les muscles squelettiques, le cœur, le tissu adipeux et le pancréas (8). Elle a aussi été détectée dans la lignée cellulaire d'ostéosarcome SaOS-2 et dans les lignées de cellule B Raji et BJAB (3,16). De plus, la différenciation des fibroblastes 3T3-L1 en adipocytes conduit à l'induction de l'expression d'APS, la protéine n'étant détectée que dans les 3T3-L1 différenciées (8).

### Fonction d'APS dans les voies de signalisation du récepteur de l'insuline

L'expression d'APS dans les tissus cibles de l'insuline ainsi que l'induction de son expression lors de l'adipogénèse des 3T3-L1 ont stimulé l'étude de sa fonction dans les voies de signalisation du récepteur de l'insuline (IR). Ce domaine de recherche sur APS est d'ailleurs le plus prolifique, donnant le meilleur aperçu de sa fonction de protéine adaptatrice.

### *Association directe du domaine SH2 d'APS au domaine tyrosine kinase de l'IR*

Plusieurs équipes ont rapporté qu'APS est un substrat de l'IR (8-10,12). Il a été montré que le domaine SH2 d'APS interagit directement avec le IR au niveau de la boucle d'activation de son domaine tyrosine kinase (IRK), plus précisément aux tyrosines 1158 et 1162 de l'IR humain (8,12). La cristallographie par rayons X du

complexe entre l'IRK et le domaine SH2 d'APS a révélé qu'un seul domaine SH2 lie les deux tyrosines de la boucle d'activation de l'IRK. La phosphotyrosine 1158 est liée de façon classique, par un pont salin, à l'arginine conservée de la poche de liaison du domaine SH2 d'APS (R445 de hAPS). La phosphotyrosine 1162 est pour sa part impliquée dans une liaison non-classique avec le domaine SH2 d'APS. En effet, cette phosphotyrosine est liée par deux lysines conservées chez APS entre les espèces, c'est-à-dire les lysines 463 et 465 de hAPS. Ces deux lysines, en plus de l'arginine invariante, sont essentielles à la liaison du domaine SH2 d'APS à l'IR (13).

*Protection contre la déphosphorylation des tyrosines de la boucle d'activation de l'IR par APS*

Il a été montré que la surexpression d'APS dans les cellules CHO.T, exprimant de façon stable le IR, conduit à l'augmentation de la sensibilité à l'insuline. En effet, la surexpression d'APS augmente l'intensité et la durée de l'autophosphorylation de l'IR ainsi que de la phosphorylation de l'IRS-1 lors de la stimulation par l'insuline. En conséquence, l'expression d'APS dans ces cellules provoque une augmentation de l'intensité et de la durée de l'activation de ERK et d'Akt à la suite de leur stimulation par l'insuline (17). Ces résultats ont permis de proposer que la liaison du domaine SH2 d'APS à la boucle d'activation de l'IR en protège les phosphotyrosines de la déphosphorylation par des PTP (13). En effet, il a été établi clairement que des PTP, notamment PTP1B, régulent de façon négative la sensibilité à l'insuline en déphosphorylant l'IR (18-20).

*Rôle essentiel d'APS en tant que protéine adaptatrice dans la phosphorylation de Cbl par le IR*

En plus d'un rôle de protection contre la déphosphorylation des tyrosines de la boucle d'activation de l'IR, APS a un rôle plus actif dans les voies de signalisation de ce récepteur. La stimulation de l'IR par l'insuline conduit à une augmentation de la captation du glucose par les cellules. Cet effet métabolique est dû à la translocation d'un pool de vésicules riches en transporteur du glucose Glut4 vers la membrane plasmique à la suite de la stimulation du récepteur. Il est connu que

l'activité PI3K est nécessaire, mais non-suffisante, à ce processus. Aussi, il a été montré que Cbl forme un complexe avec CAP (Cbl-associated protein) et que ce complexe CAP/Cbl définit une deuxième voie de signalisation, PI3K-indépendante, régulant elle aussi la captation du glucose (21). Cette voie CAP/Cbl-dépendante est cruciale à la translocation des vésicules riches en Glut4 vers la membrane cellulaire à la suite de la stimulation de l'IR (22-24). Il a été montré qu'APS a un rôle essentiel dans la régulation de cette voie (25). À la suite de son interaction avec l'IRK, mAPS devient phosphorylée sur la tyrosine 618, correspondant à la tyrosine 629 de hAPS (8). Cette tyrosine phosphorylée crée un site de liaison pour le domaine SH2 de Cbl (9,10). Il a été montré que le recrutement de Cbl à l'IR et sa phosphorylation sur tyrosine par l'IR dépendent d'APS et de sa phosphorylation sur la Y618 (10,25,26). APS est donc essentielle à l'activation de la voie CAP/Cbl en permettant le recrutement et la phosphorylation de Cbl à l'IR (25). Il a d'ailleurs été montré que la surexpression d'APS dans les adipocytes 3T3-L1 augmente la translocation des vésicules riches en Glut4 vers la membrane (10). APS jouerait aussi un rôle dans l'assemblage du complexe CAP/Cbl, mais cette fonction est moins bien comprise. APS forme un complexe avec CAP qui est dissocié à la suite de la stimulation de l'IR. Il a donc été proposé qu'APS recrute CAP vers le IR pour permettre l'assemblage du complexe CAP/Cbl (25).

Cbl est une protéine-ubiquitine ligase de type E3. Son rôle dans la dégradation ligand-dépendante par la voie ubiquitine-protéasome de EGFR, PDGFR $\alpha$ , PDGFR $\beta$  ainsi que du récepteur du CSF-1 a déjà été montré (27). Il a donc été proposé qu'APS augmente l'ubiquitination de l'IR en y recrutant Cbl (26). Cependant, l'ablation génétique de l'expression d'APS chez la souris ne modifie pas les niveaux d'expression de l'IR (9).

#### *Augmentation de la sensibilité à l'insuline et hypoinsulinémie chez les souris APS<sup>-/-</sup>*

Alors que les études effectuées au niveau cellulaire démontrent qu'APS a un rôle positif dans les voies de signalisation de l'IR, l'analyse du phénotype des souris APS<sup>-/-</sup> démontre plutôt que l'ablation d'APS augmente la sensibilité à l'insuline de l'animal (9). En effet, des tests de tolérance à l'insuline et de tolérance au glucose démontrent une captation du glucose sanguin accrue pour une insulinémie plus

faible chez les animaux  $APS^{-/-}$ . De plus, les souris  $APS^{-/-}$  démontrent une insulinémie à jeun significativement plus faible que les souris de type sauvage. Le mécanisme moléculaire impliqué dans l'augmentation de la sensibilité à l'insuline par l'ablation de l'expression d'APS n'a pu être identifié (9).

L'importance de la fonction d'APS dans les voies de signalisation du récepteur de l'insuline est soulignée davantage par la découverte d'un mécanisme de régulation de son expression dans les voies de signalisation de l'insuline du tissu adipeux (28). En effet, il a été montré qu'APS s'associe constitutivement avec un nouveau membre de la famille Asb (ankyrin and SOCS box) dont l'expression semble restreinte au tissu adipeux, Asb6. Lorsque Asb6 est exprimée, l'activation prolongée du récepteur de l'insuline conduit à une dégradation d'APS suite au recrutement des élongines B et C à la boîte SOCS d'Asb6. La fonction d'APS dans les voies du récepteur de l'insuline est donc importante et nécessite la régulation de son expression.

Bien que le rôle d'APS dans les voies de l'IR ne soit pas encore élucidé complètement et que les résultats obtenus des modèles cellulaires et animaux soient en opposition, les connaissances accumulées à ce jour donnent un aperçu des mécanismes sous-jacents à sa fonction de protéine adaptatrice. En effet, il a été montré hors de tout doute que Cbl est recrutée via son domaine SH2 à la tyrosine conservée de l'extrémité C-terminale d'APS (Y629 de hAPS), phosphorylée par l'IR. Cette association permet à Cbl d'être à son tour phosphorylée par l'IR. La fonction de protéine adaptatrice d'APS pour Cbl est par le fait même essentielle à l'activation de la voie CAP/Cbl par l'IR.

#### *Implication d'APS dans de nombreuses autres voies de signalisation*

D'autres études indiquent qu'APS joue un rôle dans une multitude de voies de signalisation. En effet, APS est le substrat de nombreux autres récepteurs transmembranaires. Comme il a été mentionné plus haut, APS s'associe directement, via son domaine SH2, au RTK c-Kit activé, plus précisément aux tyrosines 658 et 936, et devient conséquemment phosphorylée sur tyrosine (3,11,15). Il a aussi été montré que la stimulation du récepteur des antigènes des

cellules B (3,11) et que la stimulation de cellules par l'IGF-I, l'IGF-II et le GM-CSF conduisent à la phosphorylation sur tyrosine d'APS (16). L'activation du récepteur de l'interféron- $\gamma$  (INF- $\gamma$ ) et du leukemia inhibitory factor (LIF) conduisent aussi à la phosphorylation sur tyrosine d'APS (7). Une fonction d'APS a aussi été rapportée dans diverses voies de signalisation. Brièvement, il a été montré qu'APS régule de façon négative l'activité kinase de JAK1 et de JAK2, des PTK cytosoliques impliquées dans la signalisation de plusieurs cytokines et hormones, comme l'hormone de croissance (GH) et l'érythropoïétine (EPO) (29). Dans les voies du récepteur de l'EPO, l'expression d'APS diminue, en collaboration avec Cbl, l'activité transcriptionnelle de STAT5 (7). Dans les voies de TrkA, le récepteur du NGF (nerve growth factor), l'association d'APS avec la boucle d'activation du domaine tyrosine kinase du récepteur permet l'activation des MAPK (mitogen activated protein kinase) par Ras et la différenciation des cellules PC12 (30). Aussi, il a été montré que l'interaction d'APS avec le proto-oncogène Vav3, une GEF (guanosine nucleotide exchange factor) des petites GTPases Rho/Rac, en augmente son activité de transformation cellulaire et de réorganisation du cytosquelette d'actine (14). Des études effectuées sur des cellules B et des mastocytes isolés de souris *APS<sup>-/-</sup>* suggèrent aussi qu'APS joue un rôle dans le contrôle dans la réorganisation du cytosquelette d'actine (31,32). Il a été montré qu'APS est phosphorylée sur tyrosine à la suite de la stimulation des NIH 3T3 par le PDGF-AA et le PDGF-BB (16). Le domaine SH2 d'APS est suffisant pour permettre son interaction avec le PDGFR $\beta$  (16). À l'aide de phosphopeptides, il a été montré que, *in vitro*, la tyrosine 763 du PDGFR $\beta$  est un site d'association d'APS (15). Dans les voies du PDGF, l'expression d'APS diminue la prolifération cellulaire, la synthèse d'ADN et l'induction de l'expression de *c-myc* et de *c-fos*. De plus, APS et Cbl collaborent pour diminuer l'activité transcriptionnelle de *c-fos* induite par le PDGF (16).

Bref, APS est le substrat de nombreux facteurs de croissance et cytokines. Elle est impliquée dans de nombreuses voies de signalisation et dans la régulation de plusieurs processus physiologiques importants, comme la captation du glucose, la réorganisation du cytosquelette d'actine, la prolifération, la différenciation et la transformation cellulaire. Cependant, encore bien peu de connaissances ont été accumulées sur les mécanismes moléculaires sous-jacents aux effets d'APS.

## ***Fonctions des autres membres de la famille***

### *Lnk*

Lnk a été le premier membre de cette famille de protéines adaptatrices à être identifié (33). Lnk a surtout été étudiée en tant que protéine adaptatrice régulant la signalisation dans les cellules hématopoïétiques. Plusieurs études ont confirmé que Lnk a un rôle physiologique dans les voies de signalisation des récepteurs des antigènes des cellules T (TCR, T-cell antigen receptor). Tout d'abord, il a été montré que Lnk devient phosphorylée sur tyrosine à la suite de la stimulation TCR. Cette phosphorylation sur tyrosine permet son association avec la sous-unité régulatrice p85 de la PI3K ainsi qu'avec Grb2 et PLC $\gamma$  (33). De plus, Lnk inhibe l'activation de NF-AT par le TCR CD3 (34). La génération de souris *lnk*<sup>-/-</sup> et de souris transgéniques surexprimant Lnk dans les lymphocytes a permis de mettre en évidence un rôle de Lnk dans le développement des cellules B, des cellules T, dans la signalisation des cytokines chez les précurseurs hématopoïétiques et dans l'homéostasie hématopoïétique (35-39). Lnk joue donc un rôle important dans la régulation du système hématopoïétique.

### *SH2-B*

La première isolation de SH2-B a été permise grâce à son interaction avec le récepteur à haute affinité des IgE, le Fc $\epsilon$ RI (40). Plus tard, SH2-B a aussi été identifiée comme étant un partenaire d'interaction de l'IR dans des criblages par double hybride chez la levure avec l'IR comme appât (41,42). Par la suite, il a été montré que l'épissage alternatif du gène de SH2-B produit plusieurs isoformes différents, soit les isoformes  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ . Ceux-ci diffèrent par leur domaine C-terminal, le domaine SH2 étant identique entre les isoformes (43).

Il a été démontré que SH2-B est impliquée dans de nombreuses voies de signalisation. SH2-B est un substrat de l'IR, de l'IGF-IR et du PDGFR (41,44,45). L'analyse des souris SH2-B<sup>-/-</sup> démontre que sa fonction de substrat de l'IGF-IR joue un rôle critique dans la fertilité chez les souris (46). SH2-B $\beta$  est aussi un substrat du

FGFR3 et sa surexpression augmente la phosphorylation sur tyrosine et la translocation nucléaire de STAT5 à la suite de l'activation du FGFR3 (47).

JAK2 est une PTK cytosolique impliquée dans la signalisation de multiples hormones et cytokines, notamment celle de la GH et de l'INF- $\gamma$ . Il a été montré que SH2-B $\beta$  est un substrat de JAK2 ainsi qu'un puissant activateur de son activité tyrosine kinase (48,49). Cet effet est spécifique à JAK2, puisque SH2-B $\beta$  n'a aucun effet sur l'activité kinase de JAK1 et JAK3 (29). Il a été montré que la phosphorylation sur tyrosine de SH2-B $\beta$  est nécessaire à la réorganisation du cytosquelette d'actine par la GH, le PDGF, JAK1 et JAK2 (50). De plus, il a été montré que SH2-B s'associe à Rac pour réguler la réorganisation de l'actine et la motilité cellulaire (51).

SH2-B est aussi un substrat de TrkA activé par le NGF, et son expression est requise à la différenciation des cellules PC12 en neurones par le NGF (52). Dans cette voie de signalisation, SH2-B interagit de façon constitutive avec Grb2 pour permettre l'activation Ras-dépendante des MAPK (30). L'activation de la cascade MEK/ERK par le NGF conduit à la phosphorylation sur sérine/thréonine de SH2-B (53). De plus, SH2-B régule de façon positive l'activation de la voie Akt/Forkhead par le NGF dans les cellules PC12 (54). D'ailleurs, SH2-B est essentielle à la transduction des signaux de survie cellulaire dans les neurones sympathiques stimulés par le NGF (30). Il a aussi été montré que SH2-B s'oligomérisse sous la forme d'un pentamère dans les neurones. Son extrémité N-terminale (243 premiers acides aminés) est nécessaire et suffisante pour permettre cette oligomérisation. À la suite de la stimulation de cellules par le NGF, l'expression de SH2-B conduit à l'augmentation de l'intensité et de la durée de l'activation de TrkA ainsi que des MAPK. L'oligomérisation de SH2-B est nécessaire à ces effets ainsi qu'à la différenciation des cellules PC12 (55).

Alors que la fonction de Lnk semble plutôt limitée au système hématopoïétique, SH2-B semble être elle aussi, comme APS, impliquée dans plusieurs voies de signalisation par les facteurs de croissance et les cytokines. Il a d'ailleurs été montré que malgré le fait que SH2-B est un moins bon substrat de l'IR qu'APS, les deux protéines ont une fonction redondante dans les voies de l'IR (17).

### ***Le PDGF et ses récepteurs***

Le PDGF (platelet-derived growth factor) a tout d'abord été identifié comme un constituant du sang dérivé des plaquettes. Il a été montré que le PDGF a un rôle important comme facteur de croissance dans le développement et que la stimulation de cellules par le PDGF active la prolifération et la motilité. De plus, la stimulation cellulaire par le PDGF semble être une étape importante dans la conversion néoplasique des cellules exprimant le PDGFR (56-58).

### ***Les isoformes du PDGF***

Le PDGF est en fait une famille d'homo- et d'hétérodimères de chaînes polypeptidiques A et B, liées par deux ponts disulfures. La chaîne A et la chaîne B du PDGF sont toutes deux synthétisées sous la forme d'un précurseur dont la maturation sera effectuée par clivage protéolytique. Les chaînes matures, formées d'environ 100 acides aminés et partageant 60% d'identité, ont une masse moléculaire d'environ 15 kDa. Les chaînes A et B du PDGF sont encodées par deux gènes différents, localisés respectivement dans les chromosomes 7 et 22. Bien que la majorité des types cellulaires exprimant le PDGF produisent à la fois la chaîne A et la chaîne B, leur expression respective est régulée indépendamment au niveau transcriptionnel et post-transcriptionnel. L'identité des dimères (AA, AB ou BB) formés par les ponts disulfures entre les chaînes du PDGF semble être un processus aléatoire dépendant de la disponibilité relative de chacune des chaînes. Chaque chaîne du PDGF possède une série d'acides aminés impliqués dans la liaison à son récepteur. De cette façon, le dimère PDGF contient deux épitopes symétriques de liaison au récepteur (56,57).

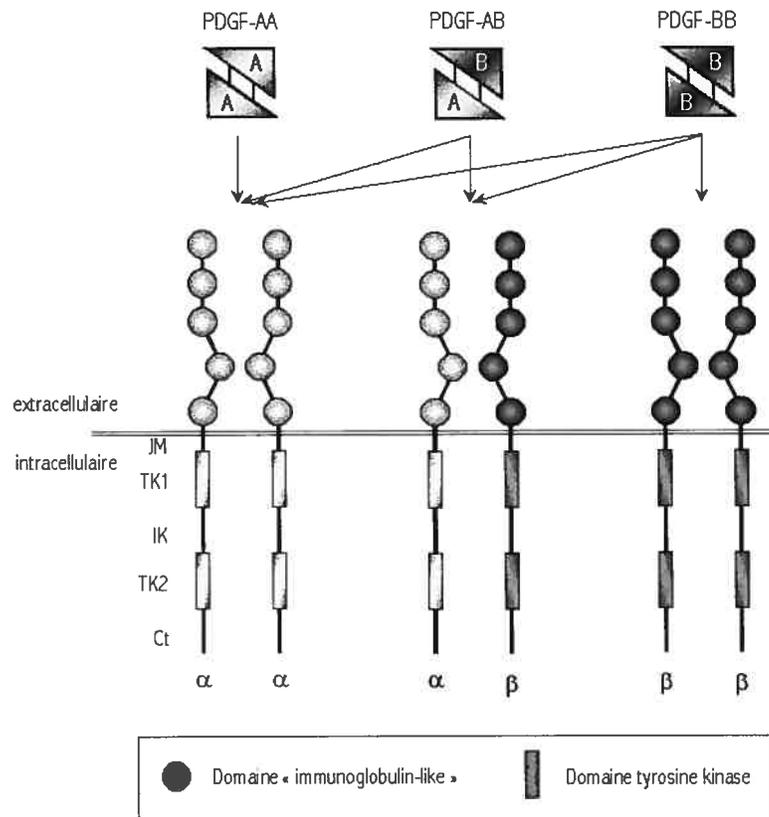
Récemment, deux nouveaux PDGF ont été identifiés, soit la chaîne C et la chaîne D (59,60). Ce sont des chaînes de 323 et 348 acides aminés, respectivement, dont l'expression est retrouvée notamment dans le cœur, le pancréas et les reins (pour une revue de la documentation scientifique sur le sujet : (61)).

## Les récepteurs du PDGF

### *Structure du PDGFR*

Les récepteurs du PDGF (PDGFR) font partie de la grande famille des RTK. Le PDGFR possède cinq domaines « immunoglobulin-like » dans son extrémité N-terminale extracellulaire et son domaine tyrosine kinase intracellulaire est interrompu par une insertion (**Figure 3**), ce qui caractérise les RTK de classe III (62). Les RTK de classe III comprennent aussi, par exemple, les récepteurs c-Kit et CSF-1R. Dans le cas du PDGFR, l'insertion interrompant le domaine tyrosine kinase est d'environ cent acides aminés. Ceux-ci ne présentent pas d'homologie de séquence avec le domaine tyrosine kinase. Plusieurs sites d'autophosphorylation y sont localisés, de même que dans le domaine juxtamembranaire et dans le domaine C-terminal. Le domaine extracellulaire du PDGFR contient aussi des sites de N- et d'O-glycosylation (57,58).

Deux récepteurs du PDGF différents mais possédant la même structure générale existent, le PDGFR $\alpha$  et le PDGFR $\beta$ . Après la maturation de leurs oligosaccharides, le PDGFR $\alpha$  et le PDGFR $\beta$  ont une masse moléculaire de 170 et 180 kDa respectivement. Par sa nature dimérique, le PDGF est lié par deux récepteurs simultanément, ce qui induit la dimérisation du PDGFR. La chaîne A du PDGF n'est reconnue que par le PDGFR $\alpha$  alors que la chaîne B est reconnue à la fois par le PDGFR $\alpha$  et le PDGFR $\beta$  (**Figure 3**). Il s'ensuit que le PDGF-AA induit uniquement l'homodimérisation du PDGFR $\alpha$ . Le PDGF-AB induit l'homodimérisation du PDGFR $\alpha$  et l'hétérodimérisation  $\alpha\beta$  alors que le PDGF-BB permet les trois combinaisons dimériques possibles (56-58).



**Figure 3 Structure des PDGFR $\alpha$  et PDGFR $\beta$  et identité des dimères de ceux-ci pouvant être induits à la suite de la liaison du PDGF-AA, -AB ou -BB**

Le PDGFR fait partie de la classe III des RTK. Cette classe est caractérisée par cinq domaines « immunoglobulin-like » dans la région extracellulaire et par une insertion interrompant le domaine tyrosine kinase intracellulaire. Les domaines de la région intracellulaire du PDGFR sont indiqués (JM : juxtamembranaire, TK : tyrosine kinase, IK : insert du domaine kinase, Ct : C-terminal). Le PDGF est une famille de dimères constitués des chaînes polypeptidiques A et B liées par deux ponts disulfures. La dimérisation de ces chaînes conduit à la formation de PDGF-AA, de PDGF-AB et de PDGF-BB. Chaque chaîne du dimère possède un épitope de liaison au PDGFR. Deux isoformes du PDGFR existent, le PDGFR $\alpha$  et le PDGFR $\beta$ . Le PDGFR $\alpha$  reconnaît les épitopes de liaison des chaînes PDGF A et PDGF B alors que le PDGFR $\beta$  ne reconnaît que la chaîne PDGF B. Il s'ensuit que chaque PDGF induit la dimérisation de différentes combinaisons de PDGFR $\alpha$  et PDGFR $\beta$ , comme illustré.

### *Synthèse et maturation du PDGFR*

Comme le PDGFR est une protéine transmembranaire, sa synthèse protéique est couplée à sa translocation au réticulum endoplasmique (RE). Le domaine N-terminal du PDGFR devient *N*-glycosylé de façon co-traductionnelle dans le RE. La *N*-glycosylation est l'ajout en bloc d'un oligosaccharide au groupement -NH<sub>2</sub> de la chaîne latérale d'asparagines. La maturation de ces *N*-glycosylations précoces par leur rognage est amorcée dans le RE. Le PDGFR est alors acheminé à l'appareil de Golgi, où la modification de ces sucres sera continuée pour former l'oligosaccharide mature appelé complexe. Une enzyme, l'endo- $\beta$ -*N*-acétylglucosaminidase H (endo H) est utilisée pour différencier les formes précoces de *N*-glycosylation de la forme complexe. Les oligosaccharides précoces sont clivés par l'endo H alors que les oligosaccharides complexes y sont résistants. Un autre type de glycosylation du PDGFR a lieu dans l'appareil de Golgi sur les groupements -OH de sérines et de thréonines, l'*O*-glycosylation. Cette glycosylation est sensible au clivage par l'*O*-glyconase. Le récepteur mature arrive par la suite à la membrane plasmique par la voie d'exocytose par défaut (63).

Pendant sa synthèse et sa maturation, le poids moléculaire du PDGFR $\beta$  passe de 130 kDa, pour sa forme aglycosylée, à 145 kDa et à 160 kDa, deux formes sensibles à l'endo H, puis à 180 kDa, poids moléculaire de sa forme mature et résistante à l'endo H. Il a été montré par la digestion par l'*O*-glyconase que seule la forme mature de 180 kDa est *O*-glycosylée. La glycosylation du récepteur n'est cependant pas requise pour la liaison du PDGF et son activation subséquente (64). Les formes immatures du récepteur peuvent donc être activées par le PDGF et leur autophosphorylation a été détectée dans des cellules intactes (65).

### *Dynamique cellulaire du PDGFR*

Le PDGFR, plutôt que d'être distribué uniformément à la surface cellulaire, est concentré dans les cavéoles. De plus, il a été montré que plusieurs des protéines impliquées dans la signalisation du PDGFR, comme la sous-unité régulatrice p85 de la PI3K et SHP-2, sont elles aussi enrichies dans les cavéoles (66). Les cavéoles sont impliquées dans le processus d'endocytose. D'ailleurs, la liaison du PDGF à

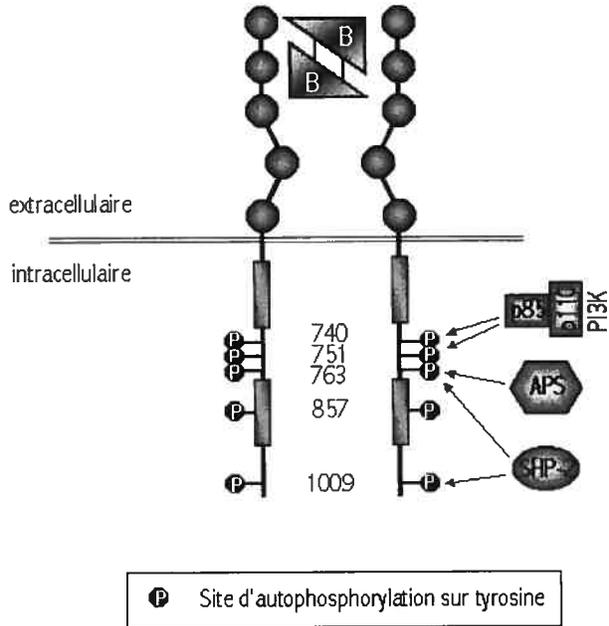
son récepteur active l'internalisation du complexe ligand-récepteur, qui se retrouve alors dans les endosomes. Il a été montré que le complexe formé du PDGFR $\beta$  et du PDGF-BB maintient sa phosphorylation sur tyrosine et son activité tyrosine kinase une fois internalisé dans les endosomes (67). Le couple récepteur-ligand peut par la suite être dissocié et le récepteur recyclé à la membrane. Alternativement, le couple récepteur-ligand peut être dégradé par la fusion des endosomes aux lysosomes et le récepteur peut aussi être dégradé par la voie protéolytique ubiquitine-protéasome (68-70). De façon globale, la liaison du PDGF au PDGFR se traduit en une diminution de sa demi-vie (56,57,70,71).

### *Signalisation intracellulaire par le PDGFR*

Le PDGF induit différentes réponses de la part des cellules, comme la croissance, la division et la survie cellulaire ainsi que la réorganisation du cytosquelette d'actine. Les voies de signalisation des trois dimères possibles du PDGFR se chevauchent, comme il est démontré par l'activation de la prolifération cellulaire et de la réorganisation du cytosquelette par chacun d'eux. Cependant, les voies de signalisation de ces trois dimères possibles ne sont pas identiques. Par exemple, le dimère du PDGFR $\beta$  active la migration cellulaire alors que le dimère du PDGFR $\alpha$  peut l'inhiber ou la stimuler, dépendamment du type cellulaire. De plus, dans les cellules de muscles lisses vasculaires (VSMC), la stimulation du PDGFR $\alpha$  conduit à l'augmentation de la synthèse protéique sans affecter la synthèse d'ADN, alors que la stimulation du PDGFR $\beta$  conduit à une réponse mitogénique complète de ces cellules (72). La stimulation du PDGFR $\beta$  est suffisante pour induire la transformation des NIH 3T3, alors que l'activation du PDGFR $\alpha$  antagonise ces effets (73). Pour sa part, il semblerait que l'hétérodimère  $\alpha\beta$  du PDGFR possède aussi des effets cellulaires uniques, comme l'induction d'un signal mitogénique plus fort comparativement aux deux homodimères. Les voies de signalisation activées dans une cellule dépendront donc d'une part de l'identité du PDGF retrouvé dans le milieu extracellulaire ainsi que, d'autre part, des récepteurs exprimés par ces cellules. Différents dimères du PDGFR pourront ainsi être obtenus, conduisant à différentes réponses cellulaires. Cependant, les connaissances accumulées sur la signalisation des PDGFR concernent surtout les homodimères du PDGFR $\alpha$  et du PDGFR $\beta$  (57).

La liaison de son ligand conduit à la dimérisation du PDGFR (74). Il s'ensuit la formation de ponts disulfures entre les deux récepteurs (75). La dimérisation du PDGFR induite par la liaison de son ligand conduit à son activation selon le modèle classique d'activation des RTK (76). La juxtaposition des domaines tyrosine kinase par la dimérisation du RTK permet la transphosphorylation du domaine intracellulaire. La phosphorylation d'une tyrosine située dans la boucle d'activation du domaine tyrosine kinase (Y857 pour le PDGFR $\beta$ ) a pour effet d'augmenter l'efficacité de catalyse de ce domaine. La phosphorylation d'autres tyrosines situées au domaine juxtamembranaire, dans l'insert du domaine kinase et à l'extrémité C-terminale du PDGFR permet le recrutement de divers effecteurs via leur domaine SH2. Parmi ces protéines recrutées au PDGFR $\beta$  via leur domaine SH2, notons APS, la phosphatidylinositol-3'-kinase (PI3K) et la PTP SHP-2 (**Figure 4**). Chaque effecteur recruté conduira à l'activation d'une voie de signalisation (56,57).

Les différentes réponses cellulaires induites par l'activation des homodimères de PDGFR $\alpha$  et de PDGFR $\beta$  s'expliquent par leur domaine intracellulaire distinct. Bien que certaines tyrosines autophosphorylées soient conservées entre les deux récepteurs, d'autres sont uniques à l'un ou à l'autre des PDGFR. Plusieurs des protéines possédant un domaine SH2 sont donc recrutées aux deux récepteurs. Cependant, certaines des protéines recrutées au PDGFR $\alpha$  peuvent ne pas l'être au PDGFR $\beta$  et vice versa. Les voies de signalisation induites sont donc semblables mais non identiques, d'où les différences dans les réponses cellulaires induites par l'activation des deux homodimères. La signalisation distincte de l'hétérodimère  $\alpha\beta$  serait pour sa part rendue possible par la phosphorylation de tyrosines qui ne le seraient pas dans l'homodimère. Le PDGFR $\alpha$  phosphorylerait donc des tyrosines du PDGFR $\beta$  que ce dernier ne peut phosphoryler et vice versa. Cette explication découle de l'observation que la Y754 du PDGFR $\alpha$  et que la Y771 du PDGFR $\beta$  ont un niveau de phosphorylation plus élevé dans l'hétérodimère que dans les homodimères respectifs (56,57).



**Figure 4 Localisation des sites d'autophosphorylation du PDGFR $\beta$  impliqués dans l'activation du récepteur et dans le recrutement d'APS, de la PI3K et de SHP-2**

La dimérisation du PDGFR $\beta$  est induite par la liaison du PDGF-BB. À la suite de cette dimérisation, il y a transphosphorylation des deux récepteurs. La phosphorylation de la tyrosine 857, située dans la boucle d'activation du domaine tyrosine kinase du PDGFR $\beta$ , en augmente l'activité catalytique. Des tyrosines situées dans le domaine juxtamembranaire, dans l'insert du domaine kinase et dans la queue C-terminale deviendront conséquemment phosphorylées. Les tyrosines permettant le recrutement, via leur domaine SH2, de la PI3K, d'APS et de SHP-2 sont indiquées.

### Fonction physiologique du PDGF

#### *Fonction normale du PDGF et de ses récepteurs*

Plusieurs types cellulaires expriment le PDGFR. Par exemple, les fibroblastes, les cellules mésangiales du rein, les VSMC et les neurones expriment le PDGFR $\alpha$  et le PDGFR $\beta$ . Des études d'ablations génétiques du PDGF-A et -B ainsi que du PDGFR $\alpha$  et  $\beta$  ont permis de mettre en évidence une fonction cruciale du PDGF dans l'angiogénèse et dans le développement du rein, des poumons et du système

cardiovasculaire (77). En effet, dans chacune de ces études, les souriceaux sont morts pendant l'embryogénèse ou en périnatalité. Il a été établi que, chez ces souris, la fonction des vaisseaux sanguins, des reins, du cœur et des poumons est altérée mortellement. De plus, certaines observations impliquent le PDGF dans le développement et dans la fonction du système nerveux central. Les neurones et les cellules de Schwann expriment à la fois les chaînes A et B du PDGF ainsi que le PDGFR $\alpha$  et le PDGFR $\beta$ . Les astrocytes expriment, pour leur part, la chaîne A et le PDGFR $\alpha$ . Il a été montré que le PDGF régule la différenciation des astrocytes et qu'il peut induire la différenciation des pré-neurones PC12. Le PDGF est aussi impliqué dans la régulation du processus de cicatrisation. Il est sécrété par différents types de cellules retrouvées au site de blessures, comme les plaquettes, les macrophages, les cellules endothéliales, les cellules musculaires lisses des artères endommagées et par les kératinocytes de l'épiderme. Il a été montré qu'il régule la fonction de différents types cellulaires impliqués dans la cicatrisation, comme les fibroblastes, les cellules de muscles lisses, les neutrophiles et les macrophages. D'ailleurs, l'application locale de PDGF augmente le taux de cicatrisation des blessures (56-58).

### *Pathologies impliquant le PDGF et ses récepteurs*

#### Le PDGF et l'oncogénèse

L'activation constitutive du PDGFR $\beta$  par la protéine E5 du virus du papillome bovin de type 1 conduit à la transformation des cellules épithéliales et fibroblastoïdes. Des aberrations structurales des gènes du PDGF ou des récepteurs, conduisant à leur surexpression ou à l'expression de protéines anormales, ont été trouvées dans différentes tumeurs chez l'humain. La stimulation autocrine par le PDGF des cellules tumorales serait d'ailleurs une étape limitante de la genèse de certains types de cancers, comme les gliomes et les sarcomes. La sécrétion de PDGF par les tumeurs permet de plus la formation de tissu stromal et participe à l'angiogénèse par un mécanisme paracrine (56,57,77).

#### Transformation cellulaire par le PDGFR $\beta$

L'action transformante du PDGF-BB et du PDGFR $\beta$  sur un modèle de transformation cellulaire, les fibroblastes NIH 3T3, est bien caractérisée. La surexpression du gène du PDGF-B ou la stimulation exogène par le PDGF-BB

induisent la transformation cellulaire des NIH 3T3. Au contraire, le PDGF-AA ne peut induire la transformation de ces cellules, suggérant que l'homodimère PDGFR $\alpha$  ne puisse activer les signaux de transformation cellulaire (78). Mais comme le PDGF-BB active à la fois le PDGFR $\alpha$  et le PDGFR $\beta$  et que les NIH 3T3 expriment les deux récepteurs, il importait de différencier l'apport relatif des deux récepteurs dans la transformation induite par le PDGF-BB. Ceci a été permis par la création de lignées NIH 3T3 dans lesquelles la signalisation du PDGFR $\alpha$  a été inhibée par la surexpression d'un dominant négatif ou par l'utilisation d'oligonucléotides antisens. À l'aide de ces cellules, il a été montré que la stimulation du PDGFR $\beta$  est suffisante pour induire la transformation cellulaire des NIH 3T3. De plus, il a été montré que l'activation du PDGFR $\alpha$  joue un rôle antagoniste sur cette transformation. En effet, les modifications phénotypiques associées à la transformation cellulaire par le PDGF-BB sont amplifiées lorsque la signalisation du PDGFR $\alpha$  est empêchée (73). Lorsque ces résultats sont mis en parallèle avec les observations faites sur les tumeurs chez l'humain, ils supportent fortement l'importance de la stimulation autocrine du PDGFR $\beta$  dans le processus d'oncogénèse (56,57).

#### Le PDGF et autres maladies

En plus de son rôle dans l'oncogénèse, le PDGF est impliqué dans diverses maladies dans lesquelles un aspect fibrotique est retrouvé. Entre autres, il a été montré qu'il est impliqué dans le processus inflammatoire et fibroprolifératif qui caractérise l'athérosclérose. En effet, les macrophages, cellules endothéliales et cellules de muscles lisses retrouvés aux sites de lésions athérosclérotiques présentent une expression accrue du PDGF et de ses récepteurs. Il a été montré que ces derniers participent à l'épaississement des parois des vaisseaux sanguins. Une expression accrue du PDGF et de ses récepteurs est aussi observée dans le processus de cirrhose hépatique. Il a aussi été suggéré que l'hyperactivité du système PDGF soit impliquée dans diverses maladies fibrotiques du poumon, comme la fibrose pulmonaire idiopathique. Enfin, différentes études ont montré que, dans le rein, l'hyperactivité du système PDGF est impliquée dans la pathogénèse de plusieurs dysfonctions glomérulaires caractérisées par la prolifération des cellules mésangiales, comme la glomérulonéphrite membranoproliférative et la néphropathie par IgA (57).

## ***La phosphatidylinositol-3'-kinase (PI3K)***

### *Introduction*

La phosphatidylinositol-3'-kinase (PI3K) est une famille d'enzymes présentes dans tous les types cellulaires. Ces enzymes catalysent la phosphorylation de la position D-3 du cycle inositol des phosphatidylinositols membranaires. Ces enzymes ont été classifiées selon leur substrat spécifique. Les membres de la classe IA sont activés en réponse à la stimulation cellulaire par les facteurs de croissance. Leur substrat *in vivo* est le phosphatidylinositol-4,5-biphosphate (PI(4,5)P<sub>2</sub>). La PI3K de classe IA activée converti donc les PI(4,5)P<sub>2</sub> membranaires en phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate (PI(3,4,5)P<sub>3</sub>). La PI3K de classe IA est un hétérodimère composé d'une sous-unité catalytique p110 $\alpha$ ,  $\beta$  ou  $\delta$ , et d'une sous-unité régulatrice dont le prototype est p85 $\alpha$  (79). La sous-unité régulatrice possède plusieurs domaines d'interaction moléculaire, dont deux domaines SH2, essentiels à l'activation de la PI3K (79). La sous-unité régulatrice maintient la sous-unité catalytique inactive dans le cytosol des cellules quiescentes. Lorsque ces cellules sont stimulées par un facteur de croissance, différents mécanismes conduisent à l'augmentation de l'activité PI3K cellulaire. D'une part, la translocation de la PI3K du cytosol vers la membrane suffit pour conduire à l'augmentation de la quantité de PI(3,4,5)P<sub>3</sub> membranaire. Cette translocation de l'enzyme vers son substrat peut être permise par l'association aux RTK via les deux domaines SH2 de la sous-unité régulatrice. Elle peut aussi être permise par l'association directe de la sous-unité catalytique aux petites protéines G isoprénylées, comme Ras. D'autre part, la liaison de phosphotyrosines par les domaines SH2 de la sous-unité régulatrice p85 de la PI3K a pour effet d'augmenter, de façon allostérique, l'activité de la sous-unité catalytique p110. L'occupation simultanée des deux domaines SH2 conduit à une plus grande activation de la PI3K que l'occupation d'un seul domaine (79-81).

L'augmentation de la concentration en PI(3,4,5)P<sub>3</sub> dans la membrane cellulaire permet la relocalisation membranaire de protéines de signalisation contenant des domaines PH reconnaissant ces PI(3,4,5)P<sub>3</sub>. Cette relocalisation de différentes protéines permet l'activation de diverses voies de signalisation. La PI3K contrôle ainsi des réponses cellulaires à la stimulation par les facteurs de croissance comme

la migration, la croissance et la survie cellulaire. La sérine/thréonine kinase Akt et sa kinase dépendante des phosphatidylinositols phosphorylés en D-3, PDK1, font partie de ces protéines possédant un domaine PH dont l'activité est régulée par la PI3K. Leur recrutement membranaire, dépendant de l'activation de la PI3K, active la PDK1 et conduit à la phosphorylation d'Akt sur la T308. Akt est aussi phosphorylée sur la S473 d'une façon PI3K dépendante, mais le mécanisme précis de cette phosphorylation n'est pas encore bien défini (82). La phosphorylation d'Akt sur ces deux résidus l'active et lui permet de phosphoryler ses différents substrats cellulaires. Parmi ces substrats, les protéines pro-apoptotiques Bad, le facteur de transcription forkhead et la caspase-9 sont inactivés par leur phosphorylation par Akt (83,84). La voie PI3K/Akt est donc ainsi impliquée dans le contrôle des signaux anti-apoptotiques cellulaires. L'activation de la PI3K participe à la régulation de la croissance cellulaire en conduisant à l'activation de la p70 S6 kinase, augmentant ainsi le taux de traduction. De plus, elle régule la réorganisation du cytosquelette d'actine via l'activation de la petite GTPase Rac (79,81).

#### La PI3K dans les voies du PDGF

La sous-unité régulatrice p85 $\alpha$  de la PI3K de classe IA se lie au PDGFR $\beta$  activé (85,86). Les deux domaines SH2 de p85 $\alpha$  s'associent directement au PDGFR $\beta$  à deux sites d'autophosphorylation (87). Il a été montré que le domaine SH2 N-terminal (N-SH2) de p85 $\alpha$  lie avec une forte affinité la tyrosine 751 du PDGFR $\beta$  alors que le domaine SH2 C-terminal (C-SH2) peut lier avec une forte affinité les tyrosines 740 et 751 (88). Ces deux tyrosines du PDGFR $\beta$ , 740 et 751, sont situées dans le consensus pYxxM de liaison des domaines SH2 de p85 $\alpha$  (79). À la suite de cette interaction, p85 $\alpha$  est phosphorylée sur sa tyrosine 508 (89,90). La fonction physiologique de cette phosphorylation par le PDGFR $\beta$  n'est pas connue. L'association de p85 $\alpha$  au PDGFR $\beta$  conduit à l'augmentation de l'activité PI3K cellulaire par deux mécanismes distincts, soit par la translocation de la sous-unité catalytique p110 à proximité de son substrat membranaire et, aussi, par allostérie, en engageant la liaison des deux domaines SH2 de p85 $\alpha$  avec les deux tyrosines du PDGFR $\beta$  (56,58).

La PI3K est impliquée dans plusieurs réponses des cellules à la stimulation par le PDGF. Dans les voies du PDGF, la PI3K est impliquée dans la réorganisation du cytosquelette d'actine nécessaire au processus d'ondulation (« ruffling ») de la membrane, étape précoce de la migration cellulaire (91-94). Il a été montré que la réorganisation du cytosquelette d'actine par Rac dans les voies du PDGF nécessite l'activation de la PI3K (79). La PI3K est donc impliquée dans la régulation de la migration cellulaire stimulée par le PDGF. Elle est aussi impliquée dans la régulation des signaux de survie cellulaire induits par le PDGF via la régulation de l'activité anti-apoptotique d'Akt. En effet, il a été montré que l'association de la PI3K au PDGFR $\beta$  est nécessaire pour permettre la transduction des signaux anti-apoptotiques du PDGF (95). La PI3K est aussi une composante importante des signaux de transformation cellulaire par le PDGFR $\beta$ . En effet, la restitution des tyrosines 740 et 751 à un mutant du PDGFR $\beta$  dont des tyrosines du domaine intracellulaire ont été mutées en phénylalanine lui permet de récupérer sa capacité à induire la transformation cellulaire, tel que caractérisée par la prolifération cellulaire indépendante de l'interaction avec la matrice extracellulaire (96). De même, l'activité PI3K est nécessaire à la transformation cellulaire des NIH 3T3 par Ras (97) et par le PDGF-BB (56,98).

### ***SHP-2 : protéine tyrosine phosphatase possédant deux domaines SH2***

#### *Introduction*

SHP-2 (aussi nommée SH-PTP2, Syp, PTP-1D, PTP-2C et PTP-N11) est un membre de la sous-famille des protéines tyrosines phosphatases (PTP) qui possèdent deux domaines SH2 en tandem à leur extrémité N-terminale (N-SH2 et C-SH2). L'expression de cette enzyme cytosolique de 68 kDa est ubiquitaire, alors que SHP-1, son proche parent, voit son expression restreinte aux cellules de lignée hématopoïétique. En plus de ces deux domaines SH2 en N-terminal, SHP-2 possède un domaine catalytique protéine tyrosine phosphatase (PTP) central et une queue C-terminale (1). De plus en plus d'études supportent le rôle critique de SHP-2 dans la régulation des voies de signalisation induites par les facteurs de croissance, les cytokines, la matrice extracellulaire et les antigènes (99).

Les domaines SH2 de SHP-2 ont tout d'abord été assignés à une fonction de relocalisation cellulaire phosphotyrosine-dépendante pour amener SHP-2 à ses substrats. Par la suite, il est devenu évident que la liaison de phosphotyrosines par SHP-2 permet la stimulation de son activité catalytique. Par exemple, un phosphopeptide, tiré de la séquence du PDGFR $\beta$  et comprenant la tyrosine 1009, stimule de façon importante l'activité phosphatase de SHP-2 *in vitro* (100). La stimulation de l'activité phosphatase de SHP-2 est davantage amplifiée par la liaison simultanée de ses deux domaines SH2 à des phosphotyrosines (101,102). En absence de liaison à des phosphotyrosines, les domaines SH2 de SHP-2 servent d'inhibiteur de son activité phosphatase. En effet, l'activité phosphatase *in vitro* d'un mutant tronqué de SHP-2 n'ayant plus de domaines SH2 est supérieure à celle de SHP-2 sauvage (103,104). Il a donc été proposé que les domaines SH2 de SHP-2 forment une interaction intramoléculaire qui inhibe l'enzyme en absence de phosphotyrosines et que cette inhibition est levée lors du recrutement de SHP-2 à des phosphotyrosines via ses domaines SH2. La cristallographie par rayons X de la structure de SHP-2 a confirmé que son domaine N-SH2 interagit de façon intramoléculaire avec le site catalytique du domaine PTP, en interdisant l'accès. L'interface d'interaction du domaine SH2 avec le domaine PTP est opposée à la poche de liaison des phosphotyrosines. La liaison d'une phosphotyrosine par le domaine N-SH2 de SHP-2 conduit par un changement conformationnel de ce dernier qui permet la libération du site actif du domaine PTP et l'activation de SHP-2 (105). Le recrutement de SHP-2 à son substrat par son domaine N-SH2 est donc couplé à l'activation de son domaine PTP. Le domaine C-SH2 fonctionnerait davantage en augmentant la concentration locale de substrats, les présentant ainsi au domaine N-SH2 (99).

La queue C-terminale de SHP-2 possède deux sites de phosphorylation sur tyrosine ainsi qu'un motif riche en proline. SHP-2 est phosphorylée sur tyrosine par le PDGFR $\beta$ , l'EGFR et v-Src et cette phosphorylation est en corrélation avec l'augmentation de son activité catalytique (106-108). Il a été montré que ces deux tyrosines, lorsque phosphorylées, sont capables d'interagir avec les deux domaines SH2, probablement de façon intramoléculaire, pour activer le domaine PTP de SHP-2 (109). Il a aussi été montré que la queue C-terminale coopère avec le domaine N-SH2 pour réprimer le domaine PTP en absence de phosphotyrosines

(103,110). Cependant, la cristallographie de SHP-2 ayant été effectuée sur une protéine tronquée de cette extrémité, le mécanisme de cette coopération n'est pas connu.

SHP-2 interagit directement avec des RTK activés via ses domaines SH2 (99). À la suite du recrutement de SHP-2 à une phosphotyrosine d'un RTK, son activité phosphatase serait dirigée vers d'autres phosphotyrosines du récepteur ou d'une protéine associée (99). Malgré son activité PTP et contrairement à SHP-1, SHP-2 régule de façon positive la signalisation de ces récepteurs. Le mécanisme sous-jacent à ce paradoxe n'est pas connu (111). L'identification des cibles cellulaires de SHP-2 permettra de mieux comprendre son action.

#### SHP-2 dans les voies du PDGFR $\beta$

SHP-2 est un substrat du PDGFR $\beta$ . Elle s'associe aux tyrosines 763 et 1009 du PDGFR $\beta$  via ses domaines SH2 et devient conséquemment phosphorylée sur ses tyrosines 542 et 580 (108,112,113). L'association de SHP-2 au PDGFR $\beta$  activé conduit à l'augmentation de l'activité PTP cellulaire, démontrant que le PDGFR $\beta$  active SHP-2 (114). Il semble aussi que le PDGFR $\beta$  soit un substrat de SHP-2. À la suite de l'association de SHP-2 au PDGFR $\beta$ , les tyrosines 740, 751 et 771 du PDGFR $\beta$  sont déphosphorylées *in vitro* et *in vivo* (115). Malgré cette déphosphorylation du PDGFR $\beta$ , l'activité phosphatase de SHP-2 a un effet positif sur l'activation de la voie MAPK Erk. Lorsque l'interaction entre le PDGFR $\beta$  et SHP-2 est empêchée, l'activation de Ras et de Erk2 est diminuée de façon significative (113,114,116). L'effet positif de SHP-2 sur l'activation de Erk par le PDGF est diminué lorsque la phosphorylation des tyrosines 542 et 580 est empêchée (112). Il a été montré que la phosphorylation de la tyrosine 542 crée un site de liaison pour Grb2, permettant de coupler l'activation du récepteur à Ras (117). Toutefois, l'implication de l'activité phosphatase de SHP-2 dans ce mécanisme n'est pas encore comprise.

### ***Relation entre la PI3K et SHP-2***

Si l'importance de SHP-2 dans la régulation de la voie des MAPK Erk est établie, sa fonction physiologique semble aussi inclure la régulation d'autres voies de signalisation, dont les voies de la PI3K. Une lignée cellulaire fréquemment utilisée pour étudier le rôle de SHP-2 dans les voies de signalisation découle de souris homozygotes mutantes dont l'exon 3 du gène de SHP-2 a été enlevé. La protéine qui résulte de cette ablation ne possède plus de domaine N-SH2. Elle ne peut donc plus être relocalisée et, conséquemment, exercer sa fonction. À l'aide de ces cellules, il a été montré que SHP-2 est essentielle à l'activation de la PI3K par l'IGF-I et par le PDGF (118,119). Dans ces voies de signalisation, la perte de la fonction de SHP-2 empêche l'activation d'Akt ainsi que l'inhibition de l'apoptose. Il a aussi été montré que la restitution de la fonctionnalité de SHP-2 augmente l'activation de la voie PI3K/Akt stimulée par l'EGF et v-Src (119,120). Ces résultats démontrent donc que SHP-2 participe à la régulation positive des signaux de survie cellulaire par la voie PI3K/Akt. À l'aide d'un mutant du PDGFR $\beta$  dont la tyrosine 1009 a été mutée en phénylalanine, il a été montré que la perte de l'association de SHP-2 et de sa phosphorylation sur tyrosine par le PDGFR $\beta$  abolit l'augmentation de l'activité PTP stimulée par le PDGF (114). Pourtant, ce PDGFR $\beta$  mutant permet l'activation de la PI3K à la même intensité que le PDGFR $\beta$  dont la tyrosine 1009 est intacte (121). Ceci suggère donc que le rôle positif de SHP-2 dans la voie PI3K/Akt activée par le PDGFR $\beta$  ne dépend ni de l'interaction de SHP-2 avec le PDGFR $\beta$  ni de son activation subséquente. Il a aussi été montré que l'activation des récepteurs de l'EGF, de l'IL-2, de l'IL-3 et de GM-CSF induit la co-immunoprécipitation de SHP-2 avec la sous-unité régulatrice p85 de la PI3K (119,122,123). Il semble que cette co-immunoprécipitation dans les voies de l'IL-3 et du GM-CSF ne soit que partiellement inhibée par des phosphopeptides correspondant aux deux régions des phosphotyrosines de la queue C-terminale de SHP-2, démontrant l'existence d'autres déterminants d'interaction entre les deux protéines (123).

### **Objectifs**

Il a été démontré qu'APS est impliquée dans plusieurs voies de signalisation contrôlant divers processus cellulaires, comme la réorganisation du cytosquelette, la prolifération, la différenciation et la transformation. L'étude de sa fonction dans les voies de signalisation du récepteur de l'insuline a confirmé l'importance de son rôle de protéine adaptatrice. Le PDGFR $\beta$  est un RTK dont l'activation induit la transduction de plusieurs signaux intracellulaires contrôlant notamment la prolifération, la survie, la migration et la transformation cellulaires. Il est impliqué dans plusieurs processus physiologiques normaux, comme la cicatrisation, et pathologiques, notamment l'oncogénèse et l'athérosclérose. En qualité de substrat du PDGFR $\beta$ , APS joue probablement un rôle important de protéine adaptatrice dans ces voies de signalisation, mais la documentation scientifique ne fournit que peu d'information sur ce sujet. Nous avons donc eu pour objectif la caractérisation du rôle d'APS dans les voies de signalisation du PDGFR $\beta$ . Dans un premier temps, nous avons caractérisé davantage l'aspect moléculaire de l'interaction *in vivo* entre le PDGFR $\beta$  avec APS. Dans un deuxième temps, nous avons étudié l'impact de l'expression d'APS dans les voies de signalisation du PDGFR $\beta$ , plus précisément au niveau de la voie de la PI3K.

## **2. Matériel et méthodes**

### ***Plasmides d'expression eucaryote utilisés***

Le plasmide pcDNA3 Myc hAPS 4-632 est un cadeau de Masahiro Yokouchi (3). Après comparaison avec la séquence de APS d'origine humaine répertoriée dans GenBank (NM\_020979), le séquençage de ce plasmide a révélé deux mutations ponctuelles, D48V et L342P. Une mutagenèse dirigée a corrigé chacune de ces mutations (**Tableau I**). Deux réactions PCR successives sur la matrice corrigée ont permis d'ajouter les acides aminés 1 à 3 d'APS, un consensus Kozak et les sites de restrictions *EcoRI/XhoI* à chaque extrémité du produit PCR final (PCR #1, S : 5'-GA AAGATCTAATGGTGCCGGCCCT-3', AS : 5'-GGCAAGCTTGTAGAAGGAGTACTG G-3', PCR #2, S : 5'-GT GGAATTCACGATGAATGGTGCCG-3', AS : 5'-CCCAGAT CTCGAGTAGAAGGAG-3'). Le produit PCR final a été cloné dans le plasmide d'expression pcDNA4-Myc/His B (Invitrogen) dans les sites de restriction *EcoRI/XhoI*. Le plasmide pcDNA4 Myc/His APS 1-632 wt ainsi obtenu a été utilisé pour la réalisation des mutants ponctuels par mutagenèse dirigée (**Tableau II**). Le plasmide pUSE PDGFR $\beta$  wt a été acheté chez Upstate. Le plasmide pUSE Amp PDGFR $\beta$  Y763F a été obtenu par mutagenèse dirigée (**Tableau II**). Le plasmide pcDNA3 Flag p85 $\alpha$  a été obtenu par sous-clonage *EcoRI/XbaI* de pME hp85 $\alpha$  (cadeau généreux de Tohru Tezuka, Tokyo) vers pcDNA3 Flag type A. Les plasmides pcDNA3 Flag APS 1-632 wt et W483H ont été obtenus par sous-clonage *EcoRI/XhoI* de pcDNA4 Myc/His APS 1-632 wt et W483H, respectivement, vers pcDNA3 Flag type A. Le plasmide pcDNA3 Flag type A (cadeau généreux de Nahum Sonenberg, Montréal) est constitué de l'épitope Flag inséré dans le site *HindIII* de pcDNA3 neo (Invitrogen). La séquence de tous les plasmides d'expression a été vérifiée par séquençage automatisé. Les séquençages ont été effectués par la Plate-forme Séquençage du Centre d'innovation McGill et Genome Quebec, à Montréal.

### **Mutagenèse dirigée**

Les différents mutants utilisés ont été générés par l'ensemble QuickChange® Site-Directed Mutagenesis (Stratagene). Les modifications suivantes ont été portées aux recommandations du fabricant : la DNA polymérase Pfu Ultra High Fidelity (Stratagene) a été utilisée, l'étape d'hybridation des amorces a été omise et 5% de DMSO ont été ajoutés à la réaction de mutagenèse. Brièvement, la mutagenèse s'effectue comme suit. Des amorces complémentaires (**Tableaux I et II**) contenant la mutation à insérer sont synthétisées en respectant les recommandations du fabricant. Le plasmide à muter doit être surenroulé et purifié à partir d'une souche bactérienne *dam*<sup>+</sup>, de sorte qu'il soit méthylé aux sites de restriction *DpnI*. À la suite de la dénaturation de la matrice et des amorces à 95°C, l'hybridation des amorces au plasmide et leur élongation sont effectuées simultanément à 68°C pour une durée de 1 minute par mille paires de bases de plasmide. L'élongation permet de synthétiser les deux brins d'un plasmide non-méthylé contenant maintenant la mutation désirée. Après 12 à 18 cycles, la matrice originale méthylée est digérée par l'enzyme de restriction *DpnI* (5'-Gm<sup>6</sup>ATC-3') et le plasmide mutant est transformé dans la souche d'*E. coli* DH5- $\alpha$ . La confirmation de l'ajout des mutations voulues et de l'absence de mutations fortuites a été obtenue par séquençage.

**Tableau I Amorces complémentaires utilisées pour la correction des mutations D48V et L342P d'APS par mutagenèse dirigée**

Les acides aminés mutants ont été restitués par mutagenèse dirigée avec l'ensemble QuickChange® Site-Directed Mutagenesis (Stratagene). La séquence des amorces sens (S) et antisens (AS) complémentaires utilisées pour la correction de chacune de ces mutations est donnée.

Correction	Séquence des amorces (5'→3')
APS D48	S: CGTTTCCTGCGGGACAACCCAGCTTACGAC AS: GTCGTAAGCTGGGTTGTCCCGCAGGAAACG
APS L342	S: CTGCTGCAGTCGACCTGCCCGCCCC AS: GGGGCGGGGCAGGTCGACTGCATCAG

**Tableau II Amorces complémentaires utilisées pour la production des mutants d'APS et du PDGFR $\beta$  par mutagenèse dirigée**

Les mutations ponctuelles indiquées ont été obtenues par mutagenèse dirigée avec l'ensemble QuickChange® Site-Directed Mutagenesis (Stratagene). La séquence des amorces sens (S) et antisens (AS) complémentaires utilisées pour la production de chacune de ces mutations est donnée.

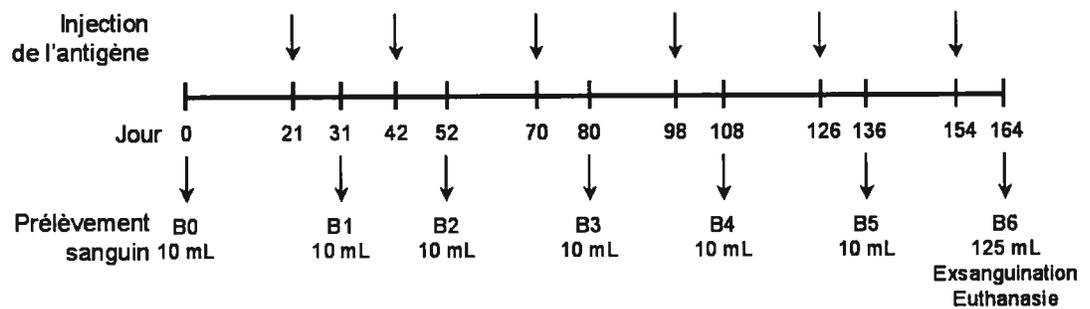
Mutant	Séquence des amorces (5'→3')
APS Y52F	S: GGACAACCCAGCTTTGACACGCCCGAC AS: GTCGGGCGTGTGCGAAAGCTGGGTTGTCC
APS Y112F	S: CAAGGCGGCGTCTTCGGCCACTCGCG AS: CGCGAGTGGCCGAAGGACGCCGCTTG
APS Y284F	S: GTAGAGAATGGAGCCGAGTTCATCTTGAGACCATCG AS: CGATGGTCTCCAAGATGAACTCGGCTCCATTCTCTAC
APS Y415F	S: GGAGCTATCCGACTTCCCATGGTTCCACG AS: CGTGGAACCATGGGAAGTCGGATAGCTCC
APS Y454F	S: CGGCCTGGGGAGTTCGTGCTGACCTTC AS: GAAGGTCAGCACGAACTCCCCAGGCCG
APS Y514F	S: GACATCACCTTCGAAGCTTTGTGCGGGCCCAG AS: CTGGGCCCGCACAAAGCTTCGAAGGGTGATGTC
APS Y546F	S: CGACTCGCCCGGGCAGCACTTCTTCTCCAGCCTC AS: GAGGCTGGAGAAGAAGTGCTGCCCGGGCGAGTCG
APS Y629F	S: CCGTGGAGAACCAGTTCTCCTTCTACTCGAGTC AS: GACTCGAGTAGAAGGAGAACTGGTTCTCCACGG
APS Y632F	S: GAACCAGTACTCCTTCTTCTCGAGTCTAGAGGG AS: CCCTCTAGACTCGAGAAGAAGGAGTACTGGTTC
APS R445K (SH2 ko)	S: CACGGCCTCTTCGTGATCAAGCAAAGTGAGACTCGGC AS: GCCGAGTCTCACTTTGCTTGATCACGAAGAGGCCGTG
APS W483H	S: GTGTCACGTACAGCATCTGCACTTCCAGTCTGTGCTTGACATG AS: CATGTCAAGCACAGACTGGAAGTGCAGATGCTGTACGTGACAC
PDGFR $\beta$ Y763F	S: GAAAGGAGACGTCAAATTTGCAGACATCGAGTCCTCC AS: GGAGGACTCGATGTCTGCAAATTTGACGTCTCCTTTC

### **Obtention d'un anticorps polyclonal de lapin anti-APS**

L'ensemble de purification par affinité de protéines étiquetées par six histidines (6xHis) *QIAexpressionist* (QIAGEN) a été utilisé pour la production de l'antigène 6xHis-APS 402-632. Le fragment d'APS obtenu par la restriction *Bam*HI/*Xho*I de pcDNA4 Myc/His APS 1-632 wt a été sous-cloné dans le vecteur d'expression bactérienne pQE 31 digéré par *Bam*HI/*Sal*I. Le respect du cadre de lecture entre APS et les six histidines ainsi que l'intégrité de l'insert ont été vérifiés par séquençage. L'expression de la protéine de fusion 6xHis-APS 402-632 a été induite pendant 4 heures à 37°C par 1 mM IPTG sur 1,5 L de culture de *E. coli*, en phase logarithmique de croissance. Les bactéries ont été récupérées par centrifugation. Les étapes de lyse et de purification par affinité sur matrice d'agarose Ni-NTA (QIAGEN) ont été effectuées dans des conditions dénaturantes (8 M d'urée) selon les indications du guide *QIAexpressionist*. L'antigène ainsi obtenu a été dialysé contre 2 M urée/PBS durant 16 heures puis une deuxième fois pendant 6 heures. Après dosage de la concentration protéique du dialysat par la méthode de Bradford (Bio-Rad Protein Assay, Bio-Rad), la concentration de l'antigène a été ajustée à 200 µg/mL. Un volume de 500 µL a été utilisé pour chacune des injections de deux lapins, identifiés 17 et 18, durant la durée de l'immunisation. Un protocole standard d'immunisation de lapin (**Figure 5**) a été utilisé après approbation du comité institutionnel de bonnes pratiques animales en recherche du centre de recherche de l'hôpital Sainte-Justine. À chacun des prélèvements sanguins (B0 à B6), le sérum a été récupéré. Un aliquot de sérum a été ajusté à 50% de glycérol et conservé à -20°C pour utilisation. La nomenclature identifiant les sérums utilise le numéro du lapin suivi du numéro de prélèvement. Par exemple, le sérum 17B6 provient du prélèvement 6 du lapin 17.

### **Culture cellulaire**

Les cellules B humaines BJAB ont été maintenues dans un milieu de culture RPMI 1640 auquel on a ajouté 10% de FBS, 50 µg/mL de gentamicine, 0,1 M de HEPES et 1 mM de pyruvate de sodium. Les fibroblastes humains 293.T ont été maintenus dans un milieu DMEM auquel on a ajouté 10% de FBS et 50 µg/mL de gentamicine. Les cellules ont été cultivées à 37 °C avec 5% de CO<sub>2</sub>.



**Figure 5 Protocole d'immunisation de lapin**

Protocole d'immunisation de lapin utilisé pour la production des sérums anti-APS sur deux lapins, identifiés 17 et 18. Les injections de 100  $\mu$ g d'antigène 6xHis-APS 402-632 par lapin ainsi que les prélèvements sanguins ont été effectués aux jours indiqués.

### ***Transfections transitoires et stimulation par le PDGF-BB des 293.T***

Les transfections transitoires des cellules 293.T ont été effectuées par la méthode de précipitation calcium-phosphate. Pour ce faire, les cellules ont été passées à 20% de confluence la veille. Dans l'après-midi, 0,9 volume de milieu de culture frais a été donné et les cellules ont été replacées dans l'incubateur pendant 2 à 4 heures (pétris 100 mm, 1 volume = 10 mL, pétris 60 mm, 1 vol = 3 mL, plaque six puits, 1 vol = 2 mL). À la fin de cette période, le précipité de calcium-phosphate (0,1 volume) a été ajouté sur les cellules, goutte-à-goutte et avec une agitation légère. Brièvement, le précipité a été obtenu par l'ajout, goutte-à-goutte et sous vortex léger, de 0,05 volume de HeBS 2X à 0,05 volume contenant 250 mM  $\text{CaCl}_2$  et l'ADN à transférer. Pour les pétris de 100 mm, de 400 à 800 ng de pcDNA4 Myc/His APS 1-632, 400 ng de pcDNA3 Flag APS 1-632, de 200 à 800 ng de pUSE Amp PDGFR $\beta$  et 2000 ng de pcDNA3 Flag p85 $\alpha$ , complété à 4  $\mu$ g d'ADN total par pcDNA3 neo, ont été utilisés. Les plasmides ont été préparés en utilisant l'ensemble GenElute High Performance Plasmid (Sigma). Pour les transfections dans les pétris

de 60 mm ou dans les plaques de six puits, le ratio masse d'ADN : surface de culture a été conservé. Les cellules auxquelles le précipité a été ajouté ont été replacées dans l'incubateur pour la nuit. Le lendemain matin, le milieu de culture a été changé pour un volume de milieu frais. Lorsque les cellules ont atteint 70 à 90 % de confluence, elles ont été soit lysées ou privées en sérum en préparation d'une stimulation. Pour la privation, elles ont été rincées avec un volume de PBS 1X puis un demi-volume de DMEM/0,1% BSA a été ajouté. Elles ont été retournées à l'incubateur pendant 2 heures. La stimulation par 30 ng/mL de PDGF-BB pendant 10 minutes a été déclenchée par l'ajout direct du volume approprié de PDGF-BB 10 ng/ $\mu$ L dans les pétris incubés à 37°C. À la fin de la période de stimulation, le milieu de culture a été aspiré et les cellules ont été lysées dans les pétris placés sur glace.

### ***Préparation des extraits cellulaires totaux et immunoprécipitations***

Pour la préparation des extraits cellulaires totaux (ECT) à partir de 293.T, le tampon de lyse utilisé a été le HNMETG (50 mM HEPES pH 7,5, 150 mM NaCl, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM EGTA, 1% Triton X-100, 10% glycérol, 50 mM NaF) auquel des inhibiteurs de protéases (1 mM PMSF, 5  $\mu$ g/mL aprotinine, 5  $\mu$ g/mL leupeptine) et de protéines tyrosines phosphatases (1 mM orthovanadate de sodium) ont été ajoutés. Lorsqu'indiqué, 5  $\mu$ M de l'inhibiteur des PTK de la famille Src, le PP2, a aussi été ajouté. Là où d'autres tampons de lyse ont été utilisés, leur identité est indiquée. Le tampon de lyse TNE (10 mM Tris-HCl pH 7,5, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% NP-40, 10 mM NaF) auquel les inhibiteurs de protéases et de protéines tyrosines phosphatases ont été ajoutés a aussi été utilisé. Les cellules BJAB ont été lysées dans du tampon de lyse « cellule B » (10 mM Tris-HCl pH7,4, 50 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% NP-40, 0,1% SDS, 0,1% désoxycholate de sodium, 50 mM NaF) auquel les inhibiteurs de protéases et de protéines tyrosines phosphatases ont été ajoutés. Tous les lysats cellulaires ont été solubilisés sur appareil rotatif à 4°C pendant 10 minutes. La fraction soluble a été obtenue après centrifugation à vitesse maximale pendant 10 minutes. La concentration des protéines de ces ECT a été évaluée par la méthode de Bradford (Bio-Rad Protein Assay, Bio-Rad) contre un étalon de BSA.

De ces ECT, 25 µg de protéines ont pu être analysées directement par immunobuvardage Western. Des immunoprécipitations (IP) ont aussi été effectuées à partir de ces ECT. Les IP anti-APS endogène effectuées sur les ECT de BJAB ont été effectuées sur 1,5 mg de protéines totales incubées 16 heures avec 20 µL d'anticorps anti-APS C-20 (Santa Cruz, # cat. sc-7223) et 30 µL de suspension d'agarose-protéine G (Invitrogen) ou avec 2 µL de sérum 17B0 ou 17B6 et 40 µL de suspension d'agarose-protéine A (Santa Cruz). Les IP sur les ECT de 293.T ont été faites comme suit. Les IP anti-APS ont été effectuées en incubant de 500 µg à 1 mg de protéines totales avec 0,75 µL de sérum 17B6 et 40 µL d'agarose-protéine A pendant 90 minutes, à moins d'indication contraire. Les IP anti-Myc ont été effectuées sur 500 µg à 1 mg de protéines totales incubées pendant 16 heures, à moins d'indication contraire, avec 1 µL d'anticorps monoclonal anti-Myc 9E10 et 40 µL d'agarose-protéine A. Le volume d'agarose protéine A a préalablement été incubé pendant 2 heures avec 1 µL d'anticorps de lapin anti-souris puis lavé deux fois. Les IP anti-Flag ont été effectuées sur 1 mg, à moins d'indication contraire, de protéines totales incubées avec 1,25 µg d'anticorps monoclonal M2 (Sigma) et 40 µL d'agarose-protéine A pendant 90 minutes. Les IP anti-SHP-2 ont été effectuées sur 750 µg de protéines totales incubées avec 2 µg d'anticorps polyclonal C-18 (Santa Cruz) et 40 µL d'agarose-protéine A pendant 16 heures. Toutes les IP ont été lavées quatre fois dans le tampon de lyse auquel 1 mM d'orthovanadate de sodium a été ajouté. Les protéines immunoprécipitées ont été éluées des billes dans 20 µL de SDS-SB 2X.

### ***Analyse des ECT et des IP par immunobuvardage Western***

Les protéines des ECT et des IP ont été séparées par SDS-PAGE 7,5%. Les protéines ainsi séparées ont été électrotransférées sur membrane de PVDF (Immobilon-P, Millipore) à 100 V pendant 60 minutes. Les immunobuvardages (IB) ont été effectués comme suit dans le tampon de lavage PBS-T 1X et dans le tampon de blocage 1% BSA/PBS-T 1X. Après l'électrotransfert, les sites de liaisons non-spécifiques de la membrane ont été bloqués par une incubation de 1 heure dans le tampon de blocage. Par la suite, la membrane a été incubée 16 heures à 4°C avec une dilution de l'anticorps primaire dans le tampon de blocage. Les

anticorps primaires utilisés ont été l'anti-APS C-20, l'anti-Myc 9E10, l'anti-phosphotyrosine (pY) 4G10, l'anti-pY PY-20 (Transduction Laboratories), l'anti-PDGFR $\beta$  (Upstate), l'anti-Flag M2 (Sigma), l'anti-p85 $\alpha$  (Upstate), l'anti-Gab2 (Upstate) et l'anti-SHP-2 C-18 (Santa Cruz). Le 4G10 a été utilisé pour tous les IB  $\alpha$ -pY, à moins d'indication contraire. La membrane a ensuite été lavée une fois 15 minutes et trois fois 5 minutes dans le tampon de lavage. Par la suite, elle a été incubée pendant 1 heure à la température de la pièce avec une dilution de l'anticorps secondaire couplé à la HRP dans le tampon de blocage. Pour l'anticorps C-20, un anti-chèvre-HRP a été utilisé. Pour les anticorps 9E10, 4G10, PY-20 et M2, un anti-souris-HRP a été utilisé. Pour les anticorps anti-Gab2, anti-PDGFR $\beta$ , anti-p85 $\alpha$  et pour le C-18, la protéine A-HRP a été utilisée. À la fin de cette incubation, les lavages de la membrane d'une fois 15 minutes et de trois fois 5 minutes ont été répétés. La révélation de la membrane a été effectuée par chimiluminescence (Western Lightning® Western Blot Chemiluminescence Reagent Plus, Perkin Elmer) à l'aide de films photosensibles (X-Omat, Kodak).

Afin de pouvoir effectuer des immunobuvardages successifs sur les mêmes membranes, elles ont été traitées dans un tampon de décapage (62,5 mM Tris pH6,8, 2% SDS, 100 mM  $\beta$ -mercaptoéthanol) afin d'enlever les anticorps de l'immunobuvardage précédent. Pour ce faire, la membrane est incubée dans un four à hybridation, immergée dans le tampon de décapage sans  $\beta$ -mercaptoéthanol. Lorsque la température de 50°C est atteinte, le  $\beta$ -mercaptoéthanol est ajouté et l'incubation est continuée pendant 30 minutes. La membrane est par la suite lavée quatre fois 10 minutes dans un grand volume d'eau, puis deux fois 5 minutes dans du PBS-T 1X. La membrane est alors prête pour initier le prochain immunobuvardage par le blocage des sites non-spécifiques. Alternativement, la membrane peut être conservée dans du PBS-T 1X/0,02% NaN<sub>3</sub> à 4°C jusqu'à utilisation ultérieure.

### ***GST-SH2 pull down***

Le lysat "Myc-APS" a été préparé comme suit. Les 293.T ont été transfectées dans 12 pétris de 100 mm avec 20 µg de pcDNA3 Myc hAPS 4-632. Lorsque les cellules ont atteint 95% de confluence, elles ont été traitées 30 minutes avec 200 nM de pervanadate puis récupérées par centrifugation. Les cellules ont été lysées dans le tampon RIPA modifié par Schlaepfer (124) supplémenté avec le cocktail d'inhibiteur de protéase Complete 1X (Roche) et par 1 mM d'orthovanadate de sodium. Après deux traitements aux ultrasons de 30 secondes et l'obtention de la fraction soluble par centrifugation, la concentration des protéines totales a été déterminée par la méthode de Bradford.

Les bactéries contenant les plasmides d'expression de protéines de fusion GST avec les domaines SH2 de diverses protéines de signalisation ont été incubées, en préculture, pendant 16 heures à 37°C. Afin d'obtenir une culture en phase logarithmique, 1 mL de préculture a été combiné à 2 mL de LBA frais et incubé 1 heure à 37°C. L'expression des protéines de fusion a été induite par 1 mM IPTG pendant 2 heures à 37°C. Les bactéries ont été récupérées par centrifugation. Le culot a été resuspendu dans 1 mL de PBS puis traité aux ultrasons sur glace pendant 15 secondes. Du Triton X-100/PBS a été ajouté jusqu'à concentration finale de 0,1% Triton X-100. Après solubilisation des extraits sur l'appareil rotatif, la fraction soluble a été récupérée par centrifugation. De façon à lier les protéines de fusion GST-SH2 à des billes, un volume de 0,9 mL de fraction soluble a été incubé 30 minutes à 4°C avec 30 µL de sépharose-glutathion. Les billes ont été lavées quatre fois dans le tampon de lyse RIPA modifié par Schlaepfer. Elles ont par la suite été incubées avec 1 mg de lysat "Myc-APS" pendant 90 minutes à 4°C. Après trois lavages dans le tampon de lyse, les billes ont été éluées dans 40 µL de SDS-SB 1X. Après dénaturation, 10 µL ont été séparés par SDS-PAGE 9% et analysés par immunobuvardage Western anti-Myc avec l'anticorps monoclonal 9E10. Pour évaluer le chargement équivalent en protéine de fusion, 20 µL ont été séparés par SDS-PAGE 7,5%. Le gel a été coloré au bleu de Coomassie.

### **3. Description et analyse des résultats**

### ***L'utilisation du sérum 17B6 pour les immunoprécipitations d'APS est valide***

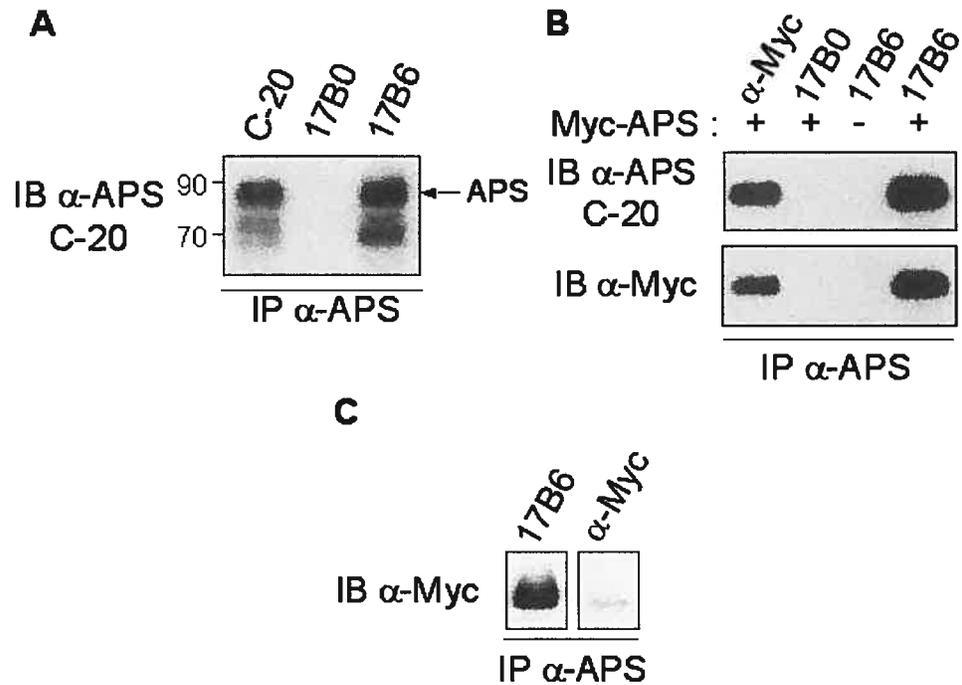
Lors de l'initiation de ce projet de recherche, les deux anticorps anti-APS disponibles sur le marché, chez Santa Cruz, présentaient des limitations pour leur application en immunoprécipitation. Le premier anticorps en question, le V-19, ne peut être utilisé en immunoprécipitation. Le deuxième anticorps, le C-20, nécessite un volume important, soit 20  $\mu\text{L}$ , pour obtenir une immunoprécipitation d'APS endogène à partir de la lignée de cellules B humaines BJAB. Dans le but de palier à ces limitations, l'immunisation de deux lapins, identifiés 17 et 18, avec l'antigène 6xHis-APS 402-632 a été faite pour obtenir un anticorps polyclonal anti-APS (**Figure 5**). La nomenclature choisie pour identifier les sérums utilise le numéro de lapin, 17 ou 18, suivi du numéro de prélèvement, B0 à B6. Des études préliminaires comparatives effectuées sur les sérums 17B2 et 18B2 ont révélé que l'anticorps provenant du lapin 17 présentait un meilleur rendement d'immunoprécipitation.

À la fin du protocole d'immunisation, différentes expériences de validation du sérum 17B6 ont été effectuées. Tout d'abord, sa capacité à immunoprécipiter APS endogène a été vérifiée. Des immunoprécipitations anti-APS endogène sur un extrait de cellules BJAB ont été effectuées avec le sérum 17B6 et l'anticorps commercial C-20, contre un contrôle négatif avec le sérum préimmun 17B0 (**Figure 6A**). L'immunobuvardage Western anti-APS sur ces immunoprécipitations démontre que l'anticorps C-20 et que le sérum 17B6 immunoprécipitent majoritairement la même protéine, dont le poids moléculaire correspond à celui attendu pour APS, soit environ 85 kDa. L'anticorps commercial C-20 utilisé pour l'immunobuvardage confirme aussi que la protéine immunoprécipitée est APS. Ceci démontre que l'anticorps polyclonal obtenu, le sérum 17B6, immunoprécipite APS endogène. L'identité des bandes observées à un poids moléculaire plus faible est inconnue. L'anticorps anti-APS C-20 n'a pas de réaction croisée avec les autres membres de la famille d'APS connus, Lnk et SH2-B. La similarité apparente de protéines non-spécifiques reconnues par le sérum 17B6 et l'anticorps C-20 s'explique par la similarité d'antigène utilisé pour la production de ces anticorps polyclonaux. En effet, la portion C-terminale de la forme humaine d'APS a servi d'antigène lors de l'immunisation dans les deux cas. Il est donc plausible que le

sérum 17B6 et l'anticorps C-20 reconnaissent plus ou moins les mêmes épitopes à la fois sur APS et sur les protéines immunoprécipitées de façon croisée, qu'elles soient des membres non-identifiés de la famille d'APS ou non.

Par la suite, l'utilisation du sérum 17B6 pour l'immunoprécipitation de Myc-APS en transfections transitoires a été validée (**Figure 6B**). Pour ce faire, des immunoprécipitations à l'aide de l'anticorps anti-Myc 9E10 ou des sérums 17B0 et 17B6 ont été effectuées sur les extraits de cellules 293.T transfectées en blanc ou avec pcDNA4-Myc/His APS wt. L'immunoprécipitation anti-Myc ainsi que les immunobuvardages anti-Myc et anti-APS avec l'anticorps C-20 confirment que la protéine immunoprécipitée par le sérum 17B6 est Myc-APS. Myc-APS n'est pas immunoprécipitée par le sérum préimmun 17B0. L'immunoprécipitation d'APS par le sérum 17B6 est spécifique à la transfection de Myc-APS. Cette dernière observation appuie l'absence d'expression endogène d'APS dans les cellules 293.T. Ensemble, les résultats des figures 6A et 6B démontrent que le sérum 17B6 immunoprécipite APS, validant son utilisation.

De plus, le sérum 17B6 permet l'immunoprécipitation de Myc-APS en 90 minutes (**Figure 6C**). L'anticorps anti-Myc n'immunoprécipite pas Myc-APS avec un bon rendement dans ces conditions. Comme une immunoprécipitation effectuée en 90 minutes a moins de probabilité de produire un artéfact via les activités enzymatiques présentes dans l'extrait cellulaire, comme les PTK, qu'une immunoprécipitation de 16 heures, le sérum 17B6 sera toujours utilisé pour les immunoprécipitations anti-APS sur les lysats de 293.T transfectées, à moins d'indication contraire.



**Figure 6 L'utilisation du sérum 17B6 pour l'immunoprécipitation d'APS est valide.**

Les immunoprécipitations (IP) anti-APS ont été effectuées avec les anticorps anti-APS C-20 et anti-Myc 9E10 ainsi qu'avec les sérums 17B0 et 17B6, comme indiqué. Les protéines immunoprécipitées ont été séparées par SDS-PAGE et analysées par immunobuvardages Western (IB) avec les anticorps indiqués. **A**, Le sérum 17B6 immunoprécipite APS endogène à partir d'un extrait de cellules BJAB. L'emplacement des marqueurs de poids moléculaire (trait, en kDa) et d'APS (flèche) est indiqué. **B**, Le sérum 17B6 immunoprécipite Myc-APS. Des cellules 293.T ont été transfectées en blanc ou avec pcDNA4-Myc/His APS wt. Après la préparation des extraits cellulaires totaux, les immunoprécipitations indiquées ont été effectuées par une incubation de 16 heures. **C**, Le sérum 17B6 permet l'immunoprécipitation de Myc-APS en 90 minutes d'incubation. Des 293.T ont été transfectées avec pcDNA4-Myc/His APS wt et les immunoprécipitations ont été effectuées par une incubation de 90 minutes.

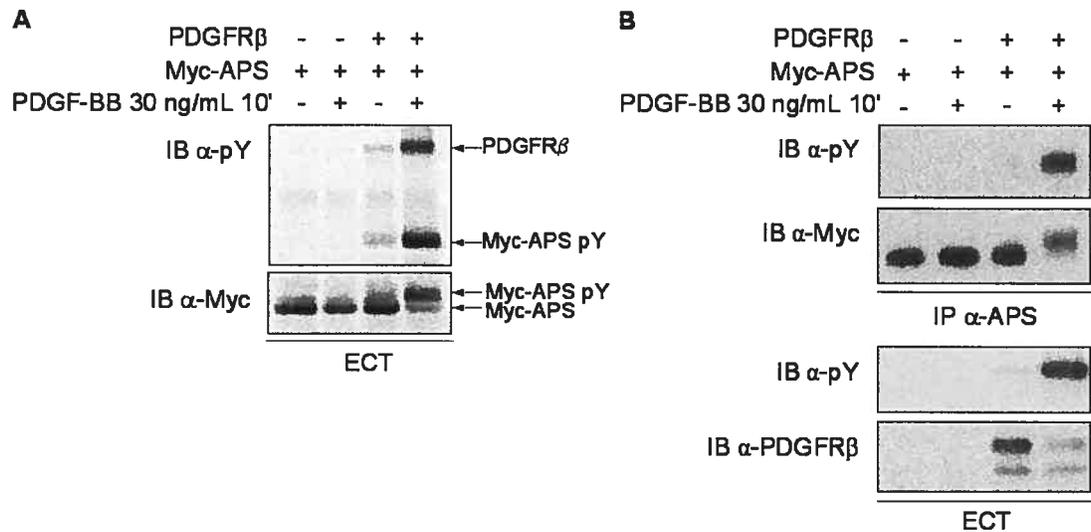
### ***Myc-APS est un substrat du PDGFR $\beta$***

Tout d'abord, la confirmation qu'APS est un substrat du PDGFR $\beta$  a été obtenue. Les événements de phosphorylation sur tyrosine dans les extraits cellulaires totaux de 293.T stimulées ou non par le PDGF-BB et transfectées ou non avec le PDGFR $\beta$  ont été étudiés (**Figure 7A**). En absence d'expression exogène du PDGFR $\beta$ , aucune autophosphorylation de récepteurs endogènes ni de phosphorylation sur tyrosine de protéines n'est détectée à la suite de la stimulation des cellules par le PDGF-BB. Comme le PDGF-BB lie et active tous les dimères de PDGFR (**Figure 3**), cette observation suggère que les 293.T n'expriment ni le PDGFR $\alpha$  ni le PDGFR $\beta$  de façon endogène. Lorsque le PDGFR $\beta$  est exprimé de façon exogène, la stimulation des cellules par le PDGF-BB conduit à l'autophosphorylation du PDGFR $\beta$  ainsi qu'à la phosphorylation sur tyrosine d'une autre protéine. De plus, l'immunobuvardage anti-Myc démontre que Myc-APS subit une diminution de sa mobilité électrophorétique à la suite de l'activation du PDGFR $\beta$  exogène. La détection de changements de poids moléculaires apparents à la suite d'une stimulation est caractéristique de modifications post-traductionnelles comme la phosphorylation. L'absence de ces changements de migration de Myc-APS lorsque les cellules n'ont pas été transfectées par le PDGFR $\beta$  soutient l'absence d'expression de PDGFR endogène dans les 293.T. La bande de Myc-APS dont le poids moléculaire apparent est supérieur co-localise avec la protéine dont la phosphorylation sur tyrosine est détectée, suggérant que Myc-APS soit phosphorylée sur tyrosine.

Dans le but de confirmer la phosphorylation sur tyrosine de Myc-APS par le PDGFR $\beta$ , une immunoprécipitation anti-APS a été effectuée sur une deuxième transfection indépendante (**Figure 7B**). Les immunobuvardages sur cette immunoprécipitation montrent l'absence de phosphorylation sur tyrosine de Myc-APS lorsque le PDGFR $\beta$  n'a pas été transfecté. L'activation du PDGFR $\beta$  exogène conduit à la phosphorylation sur tyrosine de Myc-APS et à l'augmentation de son poids moléculaire apparent. Les immunobuvardages sur les extraits cellulaires totaux confirment l'absence de PDGFR endogène dans les 293.T ainsi que

l'expression et l'activation du PDGFR $\beta$  exogène. Le PDGFR $\beta$  mature et son précurseur de 160 kDa sont détectés. De plus, une diminution du signal du PDGFR $\beta$  mature à la suite de la stimulation par le PDGF-BB est observable. Cette diminution peut s'expliquer par la dégradation ligand-dépendante du PDGFR $\beta$  (68-70). Il est aussi possible que l'anticorps utilisé (Upstate) soit phosphosensible. En effet, il a été obtenu d'une immunisation de lapin avec un court peptide constitué des acides aminés 1013 à 1025 du PDGFR $\beta$  humain, peptide contenant un site d'autophosphorylation caractérisé, la tyrosine 1021 (57). Il est important de noter la différence d'intensité entre le signal d'autophosphorylation du PDGFR $\beta$  et le signal du PDGFR $\beta$  total après la stimulation des cellules par le PDGF-BB. La différence d'intensité de signal montre que l'anticorps anti-PDGFR $\beta$  total ne possède pas la sensibilité nécessaire pour détecter de faibles quantités de PDGFR $\beta$  qui, pourtant, seraient détectables par un immunobuvardage anti-phosphotyrosine.

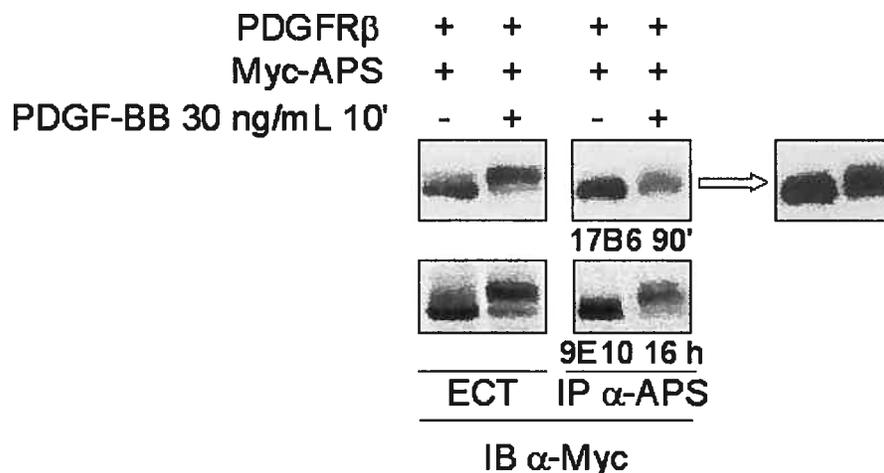
Mis ensemble, ces résultats confirment qu'APS est un substrat du PDGFR $\beta$ . De plus, ils démontrent l'absence d'expression du PDGFR $\alpha$  ou du PDGFR $\beta$  de façon endogène dans les 293.T. Ce modèle d'étude permet donc d'étudier la fonction d'APS dans les voies de signalisation du PDGFR $\beta$ .



**Figure 7 Myc-APS est un substrat du PDGFR $\beta$ .**

Des cellules 293.T ont été transfectées avec pUSE PDGFR $\beta$  wt et pcDNA4 Myc/His APS wt comme indiqué. Après privation en sérum, les cellules ont été stimulées ou non par 30 ng/mL de PDGF-BB pendant 10 minutes puis lysées sur glace dans du tampon TNE. Les extraits cellulaires totaux (ECT) et les immunoprécipitations (IP) ont été analysés par immunobuvardage Western (IB) avec les anticorps indiqués. **A**, La stimulation des 293.T par le PDGF-BB nécessite la transfection de PDGFR $\beta$  exogène pour détecter l'autophosphorylation du récepteur et la phosphorylation sur tyrosine de Myc-APS. La position du PDGFR $\beta$ , de Myc-APS et de Myc-APS phosphorylée sur tyrosine (pY) est indiquée (flèches). **B**, La phosphorylation sur tyrosine de Myc-APS par le PDGFR $\beta$  a été confirmée par une immunoprécipitation d'APS à partir d'une transfection indépendante (n=2).

En outre, une observation supplémentaire peut être faite. Pour un niveau d'expression comparable dans les ECT, la quantité de Myc-APS immunoprécipitée à partir de cellules stimulées par le PDGF-BB est comparativement plus faible que celle immunoprécipitée à partir des cellules non-stimulées (**Figure 7B**). Dans le but d'éliminer la possibilité d'un artéfact dû à l'utilisation du sérum 17B6, les anticorps anti-Myc 9E10 et 17B6 ont été comparés (**Figure 8**). La diminution d'immunoprécipitation d'APS à partir d'extraits cellulaires totaux stimulés par le PDGF-BB ne varie pas avec les anticorps comparés. En effet, alors que le niveau d'expression de Myc-APS dans les ECT ne varie pas avec la stimulation par le PDGF-BB, l'immunoprécipitation avec les anticorps 9E10 et 17B6 produit tous deux une diminution du signal de Myc-APS immunoprécipitée à partir des cellules stimulées. Il est notable que la durée d'exposition d'une même immunoprécipitation produit, sans que le signal ne soit saturé et après numérisation du film, des diminutions d'IP qui semblent différentes pour un même immunobuvardage. Cet effet de diminution sera donc plus ou moins visible en fonction de l'intensité du signal et de la durée de l'exposition. Il est possible que l'effet de diminution d'immunoprécipitation soit dû à l'événement de phosphorylation sur tyrosine comme tel. En effet, il a été montré qu'APS est un oligomère *in vivo*, mais la structure de cet oligomère est inconnue (13,55). Il est probable que la phosphorylation sur tyrosine d'APS influence sa structure tertiaire et quaternaire. Les anticorps  $\alpha$ -Myc et 17B6 reconnaissent tous deux la portion C-terminale de Myc-APS. Il est possible que les changements sur la structure tertiaire et quaternaire de Myc-APS à la suite de sa phosphorylation sur tyrosine rendent les épitopes situés en C-terminal moins disponibles, diminuant le rendement d'immunoprécipitation. Aussi, les changements de mobilité électrophorétique de Myc-APS à la suite de la stimulation du PDGFR $\beta$  a pour effet de diluer le signal sur une plus grande surface, ce qui est d'ailleurs observable dans l'IP avec l'anticorps anti-Myc 9E10. Une combinaison d'un phénomène de diminution de la disponibilité des épitopes à la suite d'un changement conformationnel dans l'oligomère et d'une dilution du signal par la production de plusieurs formes de la protéine ayant des mobilités électrophorétiques différentes pourrait donc expliquer la diminution d'immunoprécipitation de Myc-APS à partir d'ECT stimulés par le PDGF-BB.

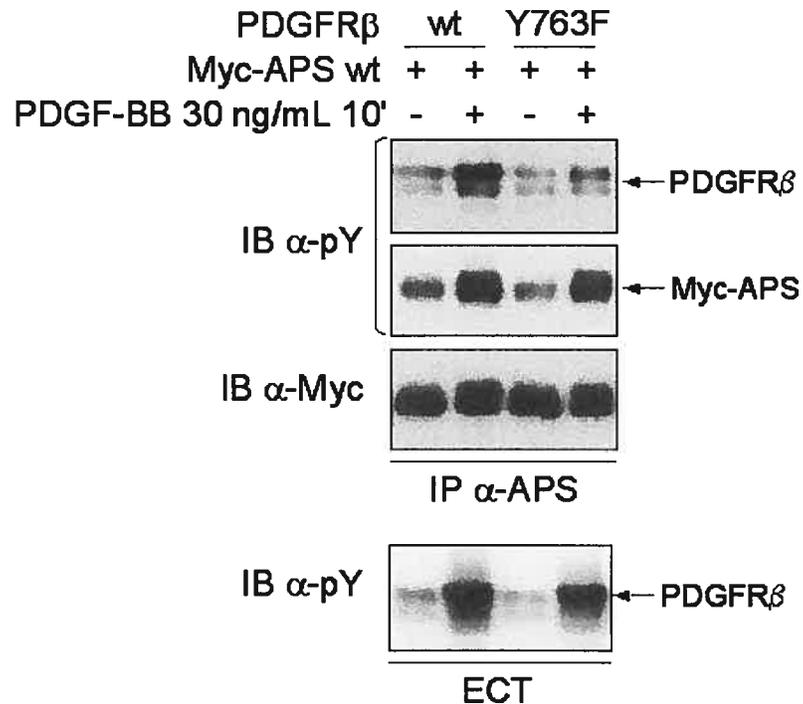


**Figure 8** L'utilisation de l'anticorps anti-Myc 9E10 ou du sérum 17B6 ne change pas la diminution du rendement d'immunoprécipitation de Myc-APS à partir de cellules stimulées par le PDGF-BB.

Des cellules 293.T ont été transfectées avec pUSE PDGFR $\beta$  wt et pcDNA4-Myc/His APS wt comme indiqué. Après privation en sérum, les cellules ont été stimulées ou non par 30 ng/mL de PDGF-BB pendant 10 minutes. Deux transfections indépendantes ont été analysées. Les immunoprécipitations (IP) ont été effectuées par une incubation de 16 heures avec l'anticorps 9E10 et par une incubation de 90 minutes avec le sérum 17B6. Les extraits cellulaires totaux (ECT) et les IP ont été analysés par immunobuvardage (IB) Western anti-Myc. La flèche indique une exposition trois fois plus longue (30 secondes vs 10 secondes) lors de la révélation de l'IB sur l'IP 17B6. Résultat représentatif de deux expériences indépendantes.

***La tyrosine 763 du PDGFR $\beta$  recrute Myc-APS in vivo, mais n'est pas essentielle à la phosphorylation sur tyrosine de Myc-APS***

Par une approche d'association d'APS à des phosphopeptides en présence ou non de compétiteurs, il a été montré qu'APS lie la tyrosine 763 du PDGFR $\beta$  *in vitro* (15). Dans le but de confirmer cette association *in vivo* et d'en étudier l'importance fonctionnelle, le mutant PDGFR $\beta$  Y763F a été produit par mutagenèse dirigée et sa capacité à s'associer et à conduire à la phosphorylation sur tyrosine de Myc-APS a été vérifiée (**Figure 9**). Dans les ECT, l'intensité d'autophosphorylation du PDGFR $\beta$  Y763F à la suite de la stimulation par le PDGF-BB est comparable à celle du PDGFR $\beta$  wt, appuyant que la mutation de la tyrosine 763 en phénylalanine ne modifie pas l'activité tyrosine kinase du récepteur. La présence d'une traînée de ce signal est caractéristique de la polyubiquitination et de la dégradation par la voie ubiquitine-protéasome du récepteur à la suite de la liaison de son ligand (69). La stimulation des cellules par le PDGF-BB augmente la co-immunoprécipitation du PDGFR $\beta$  wt avec Myc-APS ainsi que la phosphorylation sur tyrosine de Myc-APS, confirmant le recrutement de Myc-APS au PDGFR $\beta$  autophosphorylé et activé (panneaux du haut). La mutation de la tyrosine 763 en phénylalanine diminue l'augmentation de la co-immunoprécipitation du PDGFR $\beta$  avec Myc-APS à la suite de la stimulation des cellules par le PDGF-BB. Cette observation démontre que la tyrosine 763 du PDGFR $\beta$  est impliquée dans le recrutement d'APS *in vivo*. Cependant, l'intensité de la phosphorylation sur tyrosine de Myc-APS à la suite de l'activation du PDGFR $\beta$  Y763F n'est pas changée. Ceci suggère que l'association d'APS à une ou plusieurs autres tyrosines du PDGFR $\beta$  suffise pour permettre sa phosphorylation sur tyrosine. Ces résultats démontrent que la tyrosine 763 du PDGFR $\beta$  est un site d'association d'APS *in vivo*, mais qu'elle n'est pas essentielle à la phosphorylation sur tyrosine de Myc-APS. De plus, la co-immunoprécipitation du PDGFR $\beta$  Y763F avec Myc-APS démontre l'existence d'autres tyrosines permettant l'association d'APS avec le PDGFR $\beta$ .



**Figure 9** La tyrosine 763 du PDGFR $\beta$  est un site de recrutement *in vivo* de Myc-APS.

Cependant, cette tyrosine n'est pas essentielle à la phosphorylation sur tyrosine de Myc-APS. Le PDGFR $\beta$  Y763F a été obtenu par mutagenèse dirigée. Des cellules 293.T ont été transfectées avec pUSE PDGFR $\beta$  wt ou Y763F et pcDNA4-Myc/APS wt. À la suite de leur privation en sérum, elles ont été stimulées ou non avec 30 ng/mL de PDGF-BB. Après préparation des extraits cellulaires totaux (ECT), une immunoprécipitation (IP) anti-APS avec le sérum 17B6 a été effectuée. Les IP et ECT ont été analysés par immunobuvardage (IB) Western. La position du PDGFR $\beta$  et de Myc-APS sur les IB  $\alpha$ -phosphotyrosine (pY) des ECT et de l'IP est indiquée. Les panneaux supérieur et inférieur de l'IB anti-pY sur l'IP sont le résultat d'une exposition d'une minute et de 10 secondes respectivement. (n=1)

***Le domaine SH2 de Myc-APS est essentiel à son association au PDGFR $\beta$  et à sa phosphorylation, principalement sur la tyrosine 546***

Dans le but d'identifier la ou les tyrosines d'APS phosphorylées à la suite de l'activation du PDGFR $\beta$ , les mutations ponctuelles de chaque tyrosine d'APS en phénylalanine ont été produites. Il a été montré que le domaine SH2 d'APS est suffisant pour permettre son interaction *in vitro* avec le PDGFR $\beta$  (16). Afin de vérifier si le domaine SH2 d'APS est nécessaire à son association *in vivo* avec le PDGFR $\beta$  activé et à sa phosphorylation sur tyrosine, son arginine 445 a été mutée en lysine (mutant SH2 ko). Ce résidu arginine est situé dans la poche de liaison des domaines SH2 et est conservé à travers l'évolution. Il est responsable de la liaison des résidus phosphotyrosines par deux ponts salins (125,126).

La phosphorylation sur tyrosine de ces mutants de Myc-APS suite à l'activation du PDGFR $\beta$  a été étudiée, dans les extraits cellulaires totaux, par un immunobuvardage Western (**Figure 10A**). À la suite de l'activation du PDGFR $\beta$ , la phosphorylation sur tyrosine de Myc-APS wt et de tous les mutants est détectée, à l'exception des mutants SH2 ko et Y546F. De même, l'immunobuvardage anti-Myc, toujours sur les extraits cellulaires totaux, révèle que l'activation du PDGFR $\beta$  conduit à l'augmentation du poids moléculaire apparent, déjà observée (**Figure 7A**), de Myc-APS wt et de tous les mutants, à l'exception de Myc-APS SH2 ko et Y546F. Ces résultats indiquent que le domaine SH2 d'APS est nécessaire à sa phosphorylation sur tyrosine à la suite de l'activation du PDGFR $\beta$  et que la principale tyrosine d'APS phosphorylée à la suite de cette activation est la tyrosine 546.

Dans le but de confirmer que la protéine étudiée dans les extraits cellulaires totaux est bien Myc-APS, une immunoprécipitation a été effectuée (**Figure 10A**). L'immunobuvardage anti-phosphotyrosine sur cette immunoprécipitation révèle que Myc-APS SH2 ko présente une phosphorylation résiduelle sur tyrosine à la suite de l'activation du PDGFR $\beta$ . De plus, cet immunobuvardage montre que Myc-APS Y546F acquiert une phosphorylation sur tyrosine aussi intense que les autres mutants tyrosine à phénylalanine pendant l'immunoprécipitation. Il est cependant

notable que, malgré cette phosphorylation, Myc-APS Y546F conserve un poids moléculaire apparent inférieur aux autres mutants dans l'immunobuvardage anti-phosphotyrosine. Cette dernière observation suggère qu'une modification post-traductionnelle conséquente à l'activation du PDGFR $\beta$  n'a pas eu lieu sur Myc-APS Y546F, confirmant que cette tyrosine est un site de phosphorylation. La phosphorylation résiduelle sur tyrosine de Myc-APS SH2 ko suite à l'activation du PDGFR $\beta$  ainsi que la phosphorylation sur tyrosine de Myc-APS Y546F pendant l'immunoprécipitation ont été confirmés (**Figure 10B**).

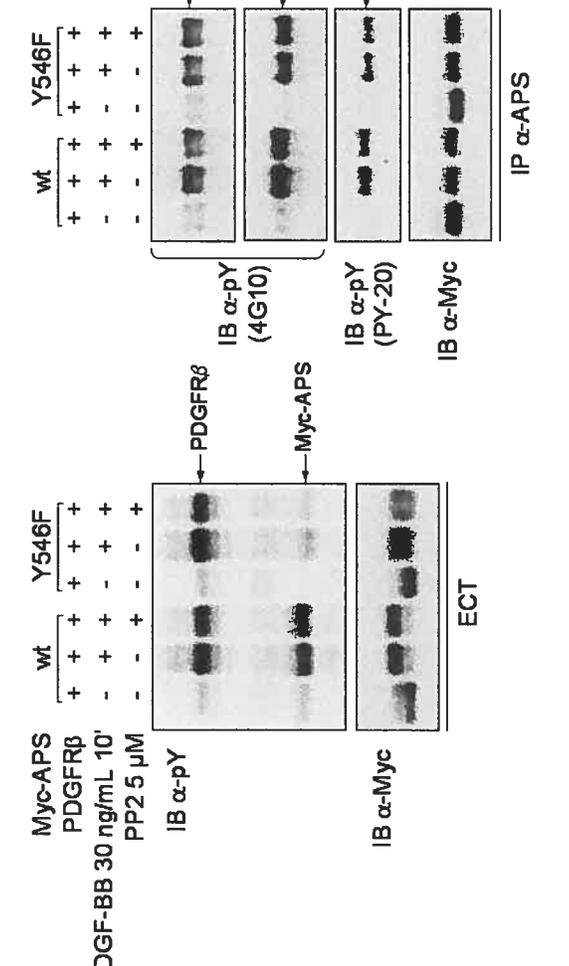
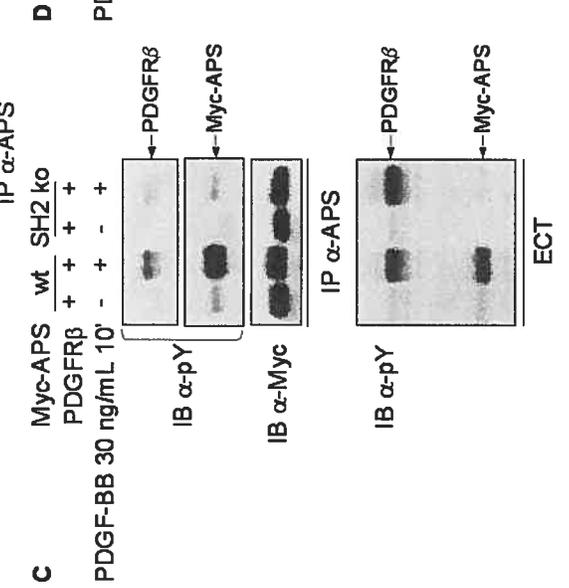
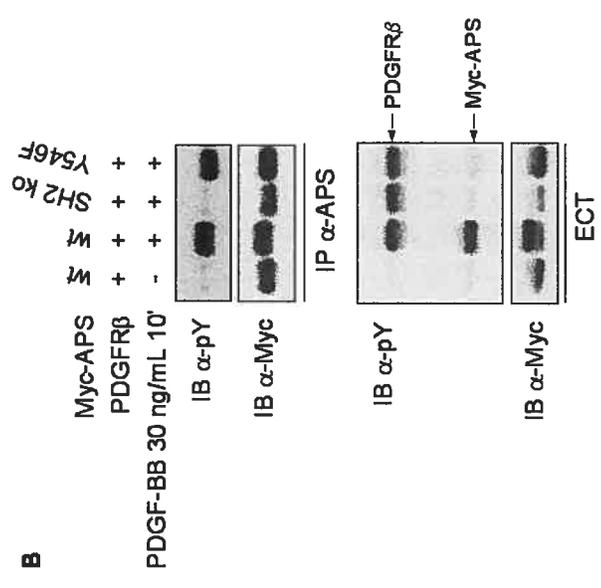
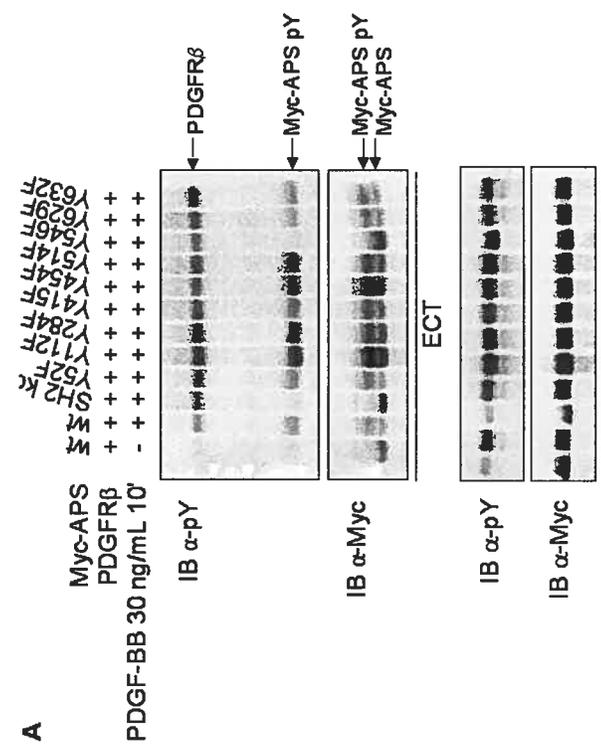
Dans le but d'expliquer la phosphorylation résiduelle sur tyrosine de Myc-APS SH2 ko à la suite de l'activation du PDGFR $\beta$ , l'interaction du récepteur avec Myc-APS wt et SH2 ko a été étudiée (**Figure 10C**). Une exposition prolongée de l'immunobuvardage anti-phosphotyrosine sur une immunoprécipitation a à nouveau permis de détecter la co-immunoprécipitation du PDGFR $\beta$  autophosphorylé avec Myc-APS wt. Cette co-immunoprécipitation du PDGFR $\beta$  autophosphorylé est retrouvée, de façon résiduelle, avec Myc-APS SH2 ko. La mutation R445K de Myc-APS SH2 ko ne semble donc pas détruire complètement l'association de Myc-APS avec le PDGFR $\beta$  autophosphorylé, expliquant ainsi la phosphorylation résiduelle de Myc-APS SH2 ko suite à l'activation du récepteur. Un résultat similaire a été rapporté à propos de l'interaction du domaine SH2 d'APS avec le récepteur de l'insuline. Dans un double hybride chez la levure, lorsque cette arginine est mutée en lysine, l'interaction d'APS avec le récepteur de l'insuline diminue mais n'est pas complètement détruite (8). Néanmoins, il a aussi été rapporté que lorsque cette arginine est mutée, cette fois, en alanine, l'interaction d'APS avec le récepteur de l'insuline est complètement empêchée (13). Il semble donc que la mutation de l'arginine invariante du domaine SH2 d'APS en lysine ne soit pas suffisante pour détruire complètement la capacité de liaison du domaine. Il est donc probable que notre mutant Myc-APS SH2 ko présente une association au PDGFR $\beta$  ainsi qu'une phosphorylation sur tyrosine résiduelles dues à la mutation de l'arginine 445 en lysine. Mis ensemble, ces renseignements appuient que le domaine SH2 d'APS est essentiel, *in vivo*, à son association avec le PDGFR $\beta$  activé et à la phosphorylation sur tyrosine d'APS à la suite de l'activation du récepteur.

Il a déjà été montré que la phosphorylation sur tyrosine d'APS par un récepteur c-Kit mutant ne pouvant plus s'associer à APS est conservée (15). Cette observation suggère qu'APS puisse être phosphorylée par une protéine tyrosine kinase (PTK) cytosolique activée par le récepteur. Les PTK cytosoliques de la famille Src sont activées par le PDGFR $\beta$  (127). Nous avons donc voulu éliminer la possibilité qu'un membre de la famille Src s'associe à Myc-APS pour conduire, pendant l'immunoprécipitation, à sa phosphorylation sur tyrosine visible pour le mutant Y546F. Pour ce faire, l'inhibiteur sélectif des membres de cette famille, le PP2, a été ajouté ou non au tampon de lyse des cellules stimulées par le PDGF-BB (**Figure 10D**). L'ajout de PP2 au tampon de lyse ne change pas de façon significative le niveau de phosphorylation sur tyrosine de Myc-APS wt dans les extraits cellulaires totaux et dans l'immunoprécipitation. De même, le PP2 n'empêche pas la phosphorylation sur tyrosine de Myc-APS Y546F pendant l'immunoprécipitation. Les PTK de la famille Src ne sont donc pas impliquées dans cet événement de phosphorylation sur tyrosine pendant l'immunoprécipitation.

Un immunobuvardage anti-phosphotyrosine avec l'anticorps PY-20 sur les immunoprécipitations a permis d'éliminer la possibilité d'un artéfact de détection dû à l'anticorps 4G10. Une exposition prolongée de l'immunobuvardage avec l'anticorps 4G10 sur les immunoprécipitations démontre la co-immunoprécipitation du PDGFR $\beta$  autophosphorylé avec Myc-APS wt et Y546F. La présence du PDGFR $\beta$  activé dans le complexe co-immunoprécipité avec Myc-APS Y546F peut expliquer la phosphorylation sur tyrosine de ce mutant pendant l'immunoprécipitation. Ceci suggère que Myc-APS puisse avoir d'autres sites de phosphorylation sur tyrosine par le PDGFR $\beta$ . À nouveau, le poids moléculaire apparent plus faible de Myc-APS Y546F dans l'immunoprécipitation malgré sa phosphorylation sur tyrosine démontre qu'un site de modification post-traductionnelle a été retiré, confirmant que la tyrosine 546 est un site de phosphorylation par le PDGFR $\beta$ .

Il est intéressant de noter les changements de poids moléculaires apparents de Myc-APS wt et Y546F dans l'immunobuvardage anti-Myc sur les extraits cellulaires totaux (**Figure 10D**). À la suite de l'activation du PDGFR $\beta$ , le poids moléculaire apparent de Myc-APS wt augmente, ce qui est dû entre autres à sa phosphorylation sur tyrosine. Malgré le retrait d'un site majeur de phosphorylation sur tyrosine, Myc-APS Y546F conserve une modification de son patron de migration suite à l'activation du PDGFR $\beta$ . Toutefois, aucune bande de Myc-APS Y546F n'atteint un poids moléculaire apparent aussi élevé que Myc-APS wt. Ceci démontre que la mutation de la tyrosine 546 retire un site de phosphorylation, mais n'empêche pas d'autres modifications post-traductionnelles d'APS à la suite de l'activation du PDGFR $\beta$ .

Dans un premier temps, ces résultats suggèrent que le domaine SH2 d'APS est essentiel, *in vivo*, à son association au PDGFR $\beta$  et à sa phosphorylation sur tyrosine à la suite de l'activation du récepteur. Dans un deuxième temps, ces résultats démontrent que la tyrosine 546 est un site principal de phosphorylation d'APS à la suite de l'activation du PDGFR $\beta$ .

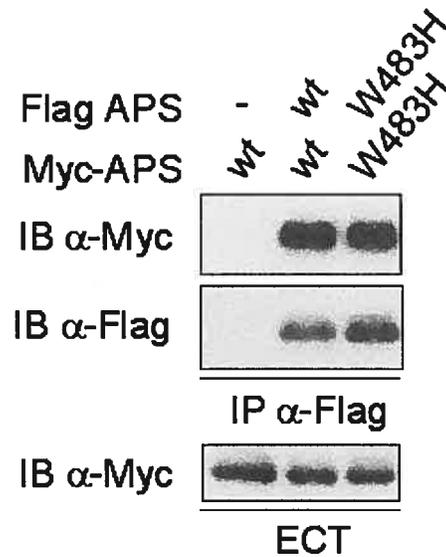


**Figure 10 Le domaine SH2 de Myc-APS est essentiel, *in vivo*, à son association avec le PDGFR $\beta$  ainsi qu'à sa phosphorylation sur tyrosine, principalement sur la tyrosine 546.**

Les mutants de Myc-APS ont été obtenus par mutagenèse dirigée. Des fibroblastes 293.T ont été transfectés avec pUSE PDGFR $\beta$  wt et pcDNA4-Myc/His APS, wt ou mutant. Les cellules ont été privées en sérum puis stimulées ou non par le PDGF-BB. Les extraits cellulaires totaux (ECT) et les immunoprécipitations (IP) anti-APS ont été analysés par immunobuvardage (IB) Western. La position du PDGFR $\beta$ , de Myc-APS et de sa forme phosphorylée sur tyrosine (pY) dans les IB  $\alpha$ -pY est indiquée. **A**, Criblage de la phosphorylation sur tyrosine de différents mutants ponctuels de Myc-APS par le PDGFR $\beta$ . Résultat représentatif de deux expériences indépendantes. **B**, Confirmation de la phosphorylation résiduelle sur tyrosine de Myc-APS SH2 ko par le PDGFR $\beta$  et de la différence de phosphorylation sur tyrosine de Myc-APS Y546F entre l'ECT et l'IP. **C**, Le PDGFR $\beta$  activé co-immunoprécipite de façon résiduelle avec Myc-APS SH2 ko (R445K). Le panneau supérieur de l'IB  $\alpha$ -pY sur l'IP est le résultat d'une exposition de 1 minute et le panneau inférieur de 15 secondes. Résultat représentatif de deux expériences indépendantes. **D**, L'inhibiteur des membres de la famille Src PP2 n'empêche pas la phosphorylation sur tyrosine de Myc-APS Y546F pendant l'immunoprécipitation. (n=1) Le PP2 (5  $\mu$ M) a été ajouté ou non au tampon de lyse (128). L'identité des anticorps anti-phosphotyrosine utilisés pour les IB sur l'IP est indiquée entre parenthèses (comme spécifié dans matériel et méthode, le 4G10 a été utilisé lorsque non-spécifié). La durée d'exposition de la révélation de l'IB 4G10 sur l'IP est de 15 secondes dans le panneau de bas et de 1 minute dans le panneau du haut.

***Le tryptophane 483 du domaine SH2 d'APS n'est pas essentiel à son oligomérisation in vivo***

Il a été montré qu'*in vivo*, APS est un oligomère constitutif (55). Par la cristallographie à rayons X du domaine SH2 d'APS, il a été démontré que ce domaine dimérise de façon constitutive (13). De plus, il a été montré que cette nature dimérique du domaine SH2 d'APS est suffisante pour permettre à APS d'oligomériser à la fois *in vitro* et *in vivo* (3,13). Le tryptophane conservé de rAPS, situé dans l'hélice  $\alpha$  permettant l'interaction des deux domaines SH2, est essentiel à la dimérisation de ce domaine d'APS. Il a été montré que la mutation de ce tryptophane en histidine détruit la dimérisation du domaine SH2. Dans le but de déterminer si la dimérisation du domaine SH2 d'APS est essentielle à son oligomérisation *in vivo*, cette mutation W475H de rAPS a été reproduite sur le tryptophane de hAPS correspondant (Myc-APS W483H). APS wt et W483H ont par la suite été sous-clonées pour être étiquetées avec l'épitope Flag. Myc-APS wt et Flag-APS wt ainsi que Myc-APS W483H et Flag-APS W483H ont été co-exprimées dans les 293.T. L'oligomérisation d'APS wt et d'APS W483H a été étudiée par la détection de la co-immunoprécipitation de Myc-APS avec Flag-APS (**Figure 11**). L'immunoprécipitation de Flag-APS wt démontre la co-immunoprécipitation de Myc-APS wt, confirmant l'oligomérisation constitutive d'APS *in vivo*. Pour démontrer que la co-immunoprécipitation de Myc-APS est spécifique à son oligomérisation avec Flag-APS, un contrôle dans lequel Flag-APS n'a pas été transfectée a été ajouté. L'immunoprécipitation de Flag-APS W483H permet de co-immunoprécipiter Myc-APS W483H. Ce résultat démontre que la mutation du tryptophane 483 en histidine n'empêche pas l'oligomérisation constitutive de hAPS *in vivo*. Il est possible que la mutation de ce tryptophane de hAPS en histidine, contrairement à rAPS, ne soit pas suffisante pour détruire la dimérisation du domaine SH2. Ce résultat suggère cependant aussi qu'il soit aussi possible qu'APS possède d'autres déterminants d'oligomérisation.

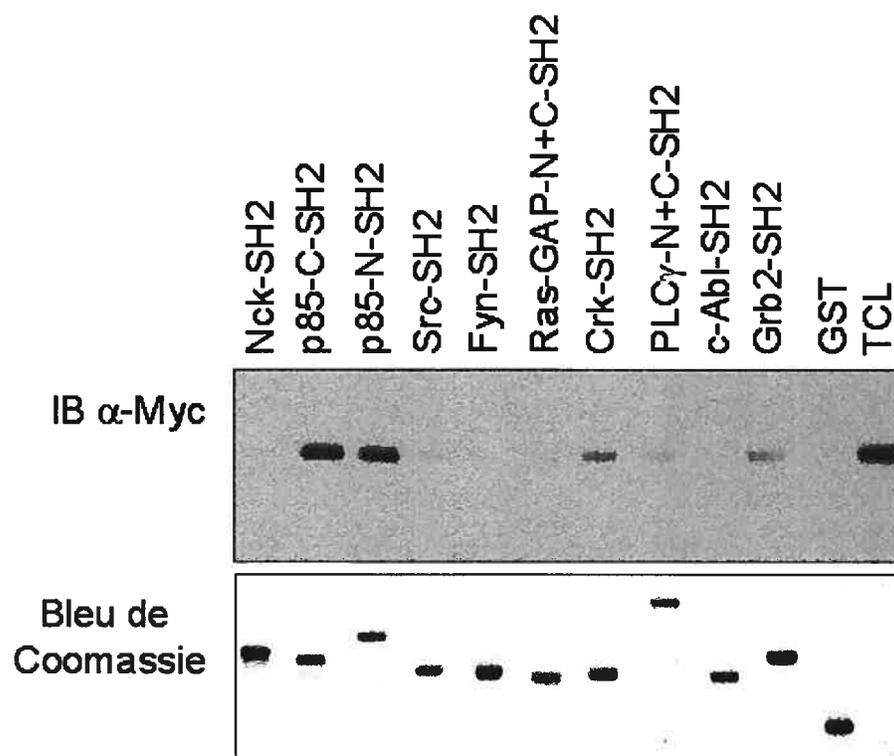


**Figure 11** Le tryptophane 483 du domaine SH2 d'APS n'est pas essentiel à son oligomérisation *in vivo*.

Le tryptophane conservé (W483 de hAPS) de l'hélice  $\alpha$  C-terminale du domaine SH2 de rAPS est essentiel à la dimérisation de ce domaine (13). Le domaine SH2 d'APS permet son oligomérisation *in vitro* et *in vivo* (3,13). La mutation W483H a été obtenue par mutagenèse dirigée. Des 293.T ont été transfectées avec pcDNA4 Myc/His APS wt ou W483H et pcDNA3 Flag APS wt ou W483H, tel qu'indiqué. Les extraits cellulaires totaux (ECT) et les immunoprécipitations (IP)  $\alpha$ -Flag ont été préparés et analysés par immunobuvardage (IB) Western. (n=1)

***Myc-APS interagit in vitro avec les domaines SH2 de la sous-unité régulatrice p85 $\alpha$  de la PI3K***

Après avoir étudié davantage l'aspect moléculaire de l'interaction entre APS et le PDGFR $\beta$ , nous avons voulu débiter la caractérisation de la fonction d'APS dans les voies de ce récepteur en criblant des partenaires possibles d'interaction. En général, les protéines adaptatrices jouent leur rôle en étant recrutées à un récepteur tyrosine kinase activé via leur domaine SH2 pour y être phosphorylées sur tyrosine. Elles recrutent par la suite d'autres protéines possédant un domaine SH2 pour initier des cascades de signalisation. La fonction d'APS dans le recrutement de Cbl au récepteur de l'insuline illustre ce mécanisme. Dans le but d'identifier des candidats partenaires d'interaction d'APS à la suite de sa phosphorylation sur tyrosine, une étude d'interaction *in vitro* par GST-SH2 pull down a été effectuée (**Figure 12**). Pour ce faire, des protéines de fusion de la GST avec des domaines SH2 provenant de diverses protéines de signalisation ont été utilisées comme appât. Elles ont été incubées avec un lysat de 293.T transfectées par Myc-APS et traitées par le pervanadate. Le pervanadate est un inhibiteur irréversible des protéines tyrosines phosphatases. *In vivo*, il modifie l'équilibre entre les activités antagonistes tyrosine kinase et tyrosine phosphatase, ce qui conduit à l'hyperphosphorylation des protéines cellulaires (129). À la suite de la résolution des protéines associées avec les appâts par SDS-PAGE, la présence de Myc-APS a été détectée par immunobuvardage. La quantité de protéine de fusion GST-SH2 utilisée comme appât a été évaluée par une coloration au bleu de Coomassie. Une interaction faible de Myc-APS avec le domaine SH2 de Grb2, PLC $\gamma$  et Crk a été détectée. Une interaction forte de Myc-APS a été détectée avec les deux domaines SH2 (N- et C-SH2) de la sous-unité régulatrice de p85 $\alpha$  de la PI3K. La quantité supérieure de protéine GST détectée par bleu de Coomassie, comparativement à GST-p85-N-SH2 et GST-p85-C-SH2, permet de contrôler la spécificité de l'interaction de Myc-APS hyperphosphorylée avec les deux domaines SH2 de p85 $\alpha$ . Ces résultats démontrent que Myc-APS hyperphosphorylée par le pervanadate dans les 293.T interagit avec les deux domaines SH2 de la sous-unité régulatrice p85 $\alpha$  de la PI3K. Ce résultat propose que l'une de ces protéines puisse jouer un rôle dans la régulation de la fonction de l'autre.



**Figure 12** Myc-APS hyperphosphorylée interagit *in vitro* avec les domaines SH2 N- et C-terminaux de p85 $\alpha$ .

GST-SH2 pull down de Myc-APS hyperphosphorylée avec les domaines SH2 de diverses protéines de signalisation. Des 293.T ont été transfectées par pcDNA3 Myc hAPS 4-632 et traitées au pervanadate pour hyperphosphoryler les protéines cellulaires. Le lysat obtenu a été incubé avec les protéines de fusion GST-SH2 indiquées, préalablement liées à des billes de sépharose-glutathion. L'interaction de Myc-APS avec les domaines SH2 a été détectée par immunobuvardage Western anti-Myc. La quantité de protéine de fusion GST-SH2 liée aux billes a été révélée par coloration de bleu de Coomassie d'un SDS-PAGE. L'association de Myc-APS à GST-p85-C-SH2 et GST-p85-N-SH2 a été obtenue dans deux expériences indépendantes.

***La co-expression de Myc-APS diminue la phosphorylation sur tyrosine de Flag-p85 $\alpha$  et son association avec le PDGFR $\beta$  activé***

La détection de l'interaction entre les domaines SH2 de p85 $\alpha$  et Myc-APS hyperphosphorylée par un traitement au pervanadate a incité l'initiation de l'étude de la relation entre APS et p85 $\alpha$  dans les voies de signalisation du PDGFR $\beta$ . La phosphorylation sur tyrosine de p85 $\alpha$  a déjà été rapportée dans différents contextes cellulaires, dont l'activation du PDGFR $\beta$  (89,90,130-133). Dans les 293.T stimulées par le PDGF-BB, la phosphorylation sur tyrosine de Flag-p85 $\alpha$ , détectée dans l'immunoprécipitation, dépend de la transfection du PDGFR $\beta$  (**Figure 13A**). Ceci confirme l'absence de PDGFR endogène dans les 293.T et l'étude des voies de signalisation du PDGFR $\beta$ . Le niveau de phosphorylation de Flag-p85 $\alpha$ , observé dans l'immunoprécipitation, est en corrélation avec le niveau d'autophosphorylation du PDGFR $\beta$ , basal et stimulé, dans les extraits cellulaires totaux. L'interaction directe de p85 $\alpha$  avec le PDGFR $\beta$  activé via ses domaines SH2 est bien caractérisée (87,88,134). Cette interaction inductible est démontrée par l'augmentation de la co-immunoprécipitation du PDGFR $\beta$  avec Flag-p85 $\alpha$  à la suite de sa stimulation.

Dans le but d'étudier l'impact de l'expression d'APS sur le recrutement de p85 $\alpha$  au PDGFR $\beta$  et sur sa phosphorylation sur tyrosine, Myc-APS a été co-transfecté ou non avec Flag-p85 $\alpha$  et PDGFR $\beta$  (**Figure 13B**). Lorsque Myc-APS est co-exprimée, une diminution de la phosphorylation sur tyrosine de Flag-p85 $\alpha$  par le PDGFR $\beta$  activé est observée dans l'immunoprécipitation. Cette diminution de phosphorylation de Flag-p85 $\alpha$  lors de la co-expression de Myc-APS s'observe à la fois au niveau basal et lors de la stimulation par le PDGF-BB. De plus, il peut être observé que pour un niveau de phosphorylation du PDGFR $\beta$  comparable dans les extraits cellulaires totaux, la quantité totale de PDGFR $\beta$  autophosphorylé co-immunoprécipitant avec Flag-p85 $\alpha$  diminue lorsque Myc-APS est co-exprimée, suggérant que Myc-APS diminue le recrutement de Flag-p85 $\alpha$  au PDGFR $\beta$ . Les différentes bandes du PDGFR $\beta$  co-immunoprécipitées avec Flag-p85 $\alpha$  sont probablement le récepteur mature ainsi que ses deux précurseurs de 160 kDa et de 145 kDa. La raison pour laquelle le précurseur de 145 kDa n'apparaît que lorsque Myc-APS n'est pas surexprimée est inconnue. Nous proposons que l'ajout de

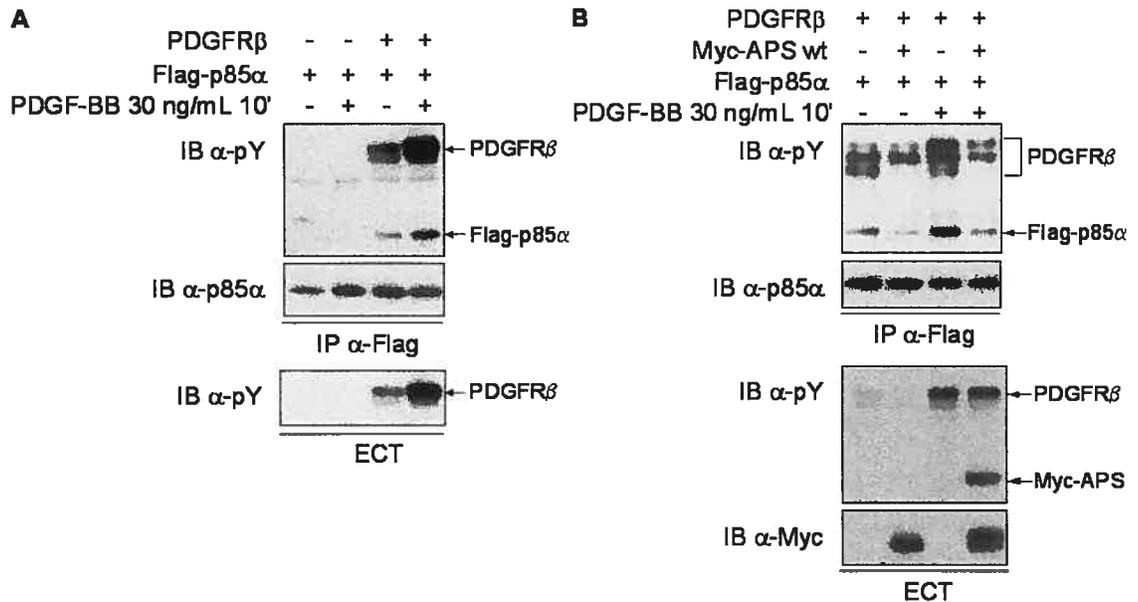
l'ARNm de Myc-APS par sa transfection diminue la quantité d'ARNm du PDGFR $\beta$  pouvant être traduit, désengorgeant le système de glycosylation des protéines. Il est à noter que nous n'avons pu détecter la co-immunoprécipitation de Myc-APS et de Flag-p85 $\alpha$  dans les voies de signalisation du PDGFR $\beta$ . Cette absence de co-immunoprécipitation malgré la détection d'une interaction en GST-SH2 pull down (**Figure 12**) peut s'expliquer par les traitements distincts utilisés. En effet, le patron de phosphorylation sur tyrosine d'APS suite à l'activation du PDGFR $\beta$  est probablement différent de celui obtenu à la suite d'un traitement par le pervanadate (voir la discussion).

Ces résultats démontrent que la co-expression de Myc-APS diminue la phosphorylation sur tyrosine de Flag-p85 $\alpha$  par le PDGFR $\beta$  et l'association du PDGFR $\beta$  activé avec Flag-p85 $\alpha$ . Ces résultats suggèrent donc fortement que Myc-APS diminue le recrutement de p85 $\alpha$  au PDGFR $\beta$  activé et, conséquemment, sa phosphorylation sur tyrosine par ce récepteur.

***La co-expression de Myc-APS diminue la co-immunoprécipitation de SHP-2 avec Flag-p85 $\alpha$  dans les voies du PDGFR $\beta$***

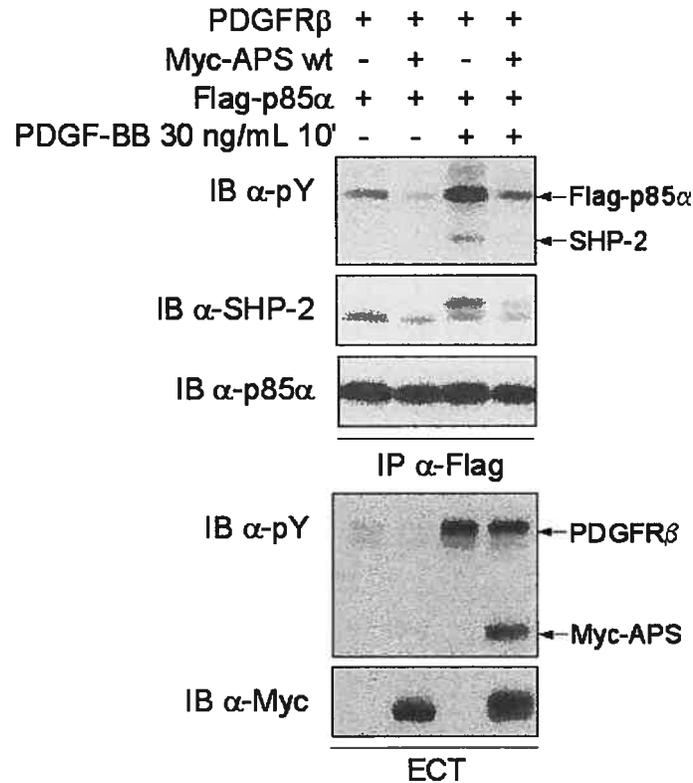
L'importance de l'expression de SHP-2 pour l'activation de la voie de signalisation PI3K/Akt par le PDGF a été montrée dans plusieurs contextes cellulaires (118,119). L'interaction de SHP-2 et p85 $\alpha$  a été montrée par leur co-immunoprécipitation à la suite de la stimulation des récepteurs de l'EGF, de l'IL-2, de l'IL-3 et du GM-CSF (119,122,123). Nous avons donc voulu déterminer si, dans un premier temps, SHP-2 interagit avec p85 $\alpha$  dans les voies du PDGFR $\beta$  et si, dans un deuxième temps, Myc-APS module cette interaction (**Figure 14**). L'immunoprécipitation de Flag-p85 $\alpha$  démontre la co-immunoprécipitation de SHP-2. De plus, cette co-immunoprécipitation de SHP-2 avec Flag-p85 $\alpha$  est inductible par la stimulation du PDGFR $\beta$ . La phosphorylation sur tyrosine de SHP-2 par le PDGFR $\beta$  (108,112) est détectée dans l'immunobuvardage anti-phosphotyrosine et elle se traduit par un changement de mobilité électrophorétique, d'où l'apparition du doublet dans l'immunobuvardage anti-SHP-2 sur les immunoprécipitations. Lorsque Myc-APS est co-exprimée dans les 293.T, la co-immunoprécipitation de SHP-2 avec Flag-p85 $\alpha$

est diminuée tant au niveau basal qu'après la stimulation du PDGFR $\beta$ . Ces résultats démontrent une nouvelle association protéique dans les voies du PDGFR $\beta$ , entre SHP-2 et p85 $\alpha$ . Ces résultats montrent aussi que la co-expression d'APS diminue cette association.



**Figure 13** La co-expression de Myc-APS diminue la phosphorylation sur tyrosine de Flag-p85 $\alpha$  par le PDGFR $\beta$  et la co-immunoprécipitation du récepteur avec Flag-p85 $\alpha$ .

Des cellules 293.T ont été transfectées avec pUSE PDGFR $\beta$  wt, pcDNA3 Flag p85 $\alpha$  et pcDNA4-Myc/His APS wt, comme indiqué. Après privation en sérum, les cellules ont été stimulées ou non par 30 ng/mL de PDGF-BB pendant 10 minutes. Les extraits cellulaires totaux (ECT) et les immunoprécipitations (IP)  $\alpha$ -Flag ont été analysées par immunobuvardage (IB) Western. La position du PDGFR $\beta$ , de Flag-p85 $\alpha$  et de Myc-APS sur les IB  $\alpha$ -pY est indiquée. **A**, La phosphorylation sur tyrosine de Flag-p85 $\alpha$  par le PDGF-BB dans les 293.T est spécifique au PDGFR $\beta$ . Le PDGFR $\beta$  activé co-immunoprécipite avec Flag-p85 $\alpha$ . **B**, La co-expression de Myc-APS diminue la phosphorylation sur tyrosine de Flag-p85 $\alpha$  par PDGFR $\beta$  et la co-immunoprécipitation de PDGFR $\beta$  avec Flag-p85 $\alpha$ . Résultat représentatif de trois expériences indépendantes.



**Figure 14** La co-expression de Myc-APS diminue la co-immunoprécipitation de SHP-2 avec Flag-p85 $\alpha$ .

Des cellules 293.T ont été transfectées avec pUSE PDGFR $\beta$  wt, pcDNA4-Myc/His APS wt et pcDNA3 Flag p85 $\alpha$ . Elles ont été privées en sérum et stimulées ou non par 30 ng/mL de PDGF-BB pendant 10 minutes. Les immunoprécipitations (IP) anti-Flag, effectuées sur 2 mg de protéines totales, et les extraits cellulaires totaux (ECT) ont été analysés par immunobuvardage (IB) Western avec les anticorps indiqués. La position de Flag-p85 $\alpha$ , de SHP-2, du PDGFR $\beta$  et de Myc-APS dans les IB  $\alpha$ -pY est indiquée. Ce résultat est représentatif de deux expériences indépendantes.

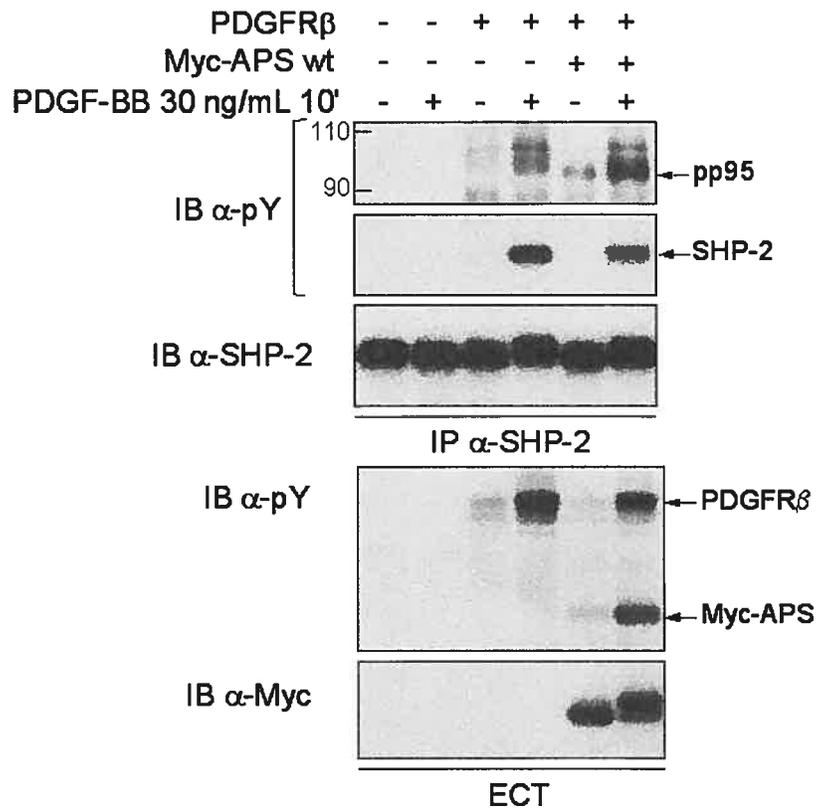
***Myc-APS ne modifie pas la phosphorylation sur tyrosine de SHP-2 dans les voies du PDGFR $\beta$***

Nos résultats confirment que p85 $\alpha$  et SHP-2 sont toutes deux phosphorylées sur tyrosine à la suite de l'activation du PDGFR $\beta$ . De plus, ils montrent que la co-immunoprécipitation de SHP-2 avec Flag-p85 $\alpha$  est inductible par l'activation du PDGFR $\beta$ , suggérant que cette interaction soit dépendante de la phosphorylation sur tyrosine de l'un ou l'autre des partenaires. SHP-2 et p85 $\alpha$  possèdent toutes deux des domaines SH2. Nos résultats démontrent aussi que la co-expression de Myc-APS diminue la phosphorylation sur tyrosine de Flag-p85 $\alpha$  ainsi que l'association de SHP-2 avec Flag-p85 $\alpha$ . Nous avons donc voulu déterminer si Myc-APS module aussi la phosphorylation sur tyrosine de SHP-2 dans les voies du PDGFR $\beta$ . Après l'immunoprécipitation de SHP-2, sa phosphorylation sur tyrosine à la suite de la stimulation des cellules par le PDGF-BB n'est détectée que lorsque le PDGFR $\beta$  a été transfecté (**Figure 15**). Cette observation, cumulée à l'absence de phosphorylation de Flag-p85 $\alpha$  et de Myc-APS sans l'expression de PDGFR $\beta$  exogène, confirme que les résultats obtenus s'appliquent aux voies de signalisation du PDGFR $\beta$ . L'immunobuvardage anti-phosphotyrosine sur l'immunoprécipitation de SHP-2 permet de détecter la phosphorylation sur tyrosine de SHP-2 à la suite de l'activation du PDGFR $\beta$  exogène. L'immunobuvardage anti-SHP-2 sur cette immunoprécipitation montre une augmentation du poids moléculaire apparent de SHP-2 à la suite de l'activation du PDGFR $\beta$ . La co-expression de Myc-APS n'influence pas de façon significative la phosphorylation sur tyrosine de SHP-2 à la suite de l'activation du PDGFR $\beta$ . En effet, la légère diminution de phosphorylation sur tyrosine de SHP-2 semble être en corrélation avec la légère diminution d'autophosphorylation du PDGFR $\beta$  dans les ECT. Ce résultat suggère donc que la diminution de l'association de SHP-2 avec Flag-p85 $\alpha$  lors de la co-expression de Myc-APS ne soit pas due à une modification de la phosphorylation sur tyrosine de SHP-2. La co-immunoprécipitation de SHP-2 avec p85 $\alpha$  dans les voies du PDGFR $\beta$  semble donc dépendre de la phosphorylation sur tyrosine de p85 $\alpha$ . Il est à remarquer que nous n'avons pas détecté la co-immunoprécipitation de SHP-2 et de Myc-APS dans les voies de signalisation du PDGFR $\beta$ . La co-immunoprécipitation du

PDGFR $\beta$  autophosphorylé avec SHP-2, de façon inductible par la stimulation du récepteur, a été détectée (résultat non-montré).

***L'expression de Myc-APS permet la détection, à la suite de l'activation du PDGFR $\beta$ , d'une phosphoprotéine de 95 kDa co-immunoprécipitant avec SHP-2***

L'exposition prolongée de l'immunobuvardage anti-phosphotyrosine sur l'immunoprécipitation anti-SHP-2 a permis la détection d'une phosphoprotéine d'environ 95 kDa, présente uniquement lorsque Myc-APS est co-exprimée (**Figure 15**). L'intensité du signal de cette phosphoprotéine augmente à la suite de l'activation du PDGFR $\beta$ . Il est connu que la protéine adaptatrice Gab2, dont le poids moléculaire est d'environ 97 kDa, s'associe avec SHP-2 et p85 $\alpha$  à la suite de sa phosphorylation (135). Par contre, un immunobuvardage contre Gab2 a confirmé que la phosphoprotéine détectée lors de la co-expression de Myc-APS n'est pas Gab2. Il est possible que la co-expression de Myc-APS permette la détection de cette phosphoprotéine en servant d'intermédiaire d'association avec SHP-2. Cependant, l'absence de Myc-APS dans l'immunoprécipitat rend ce mécanisme improbable. Il est plutôt possible que Myc-APS permette le recrutement de cette protéine au PDGFR $\beta$  pour y être phosphorylée sur tyrosine, permettant ainsi sa détection. Il est cependant impossible de déterminer si son interaction avec SHP-2 dépend de sa phosphorylation sur tyrosine ou si elle s'associe à SHP-2 malgré l'absence de cette phosphorylation permise par Myc-APS. Ce résultat démontre qu'APS a une fonction de protéine adaptatrice pour une protéine non-identifiée, endogène aux 293.T, en permettant sa phosphorylation sur tyrosine à la suite de l'activation du PDGFR $\beta$ .



**Figure 15** L'expression de Myc-APS ne diminue pas la phosphorylation sur tyrosine de SHP-2 à la suite de l'activation du PDGFR $\beta$ .

La détection d'une phosphoprotéine de 95 kDa co-immunoprécipitant avec SHP-2 de façon inductible par l'activation du PDGFR $\beta$  dépend de la co-expression de Myc-APS. Des 293.T ont été transfectées avec pUSE PDGFR $\beta$  wt et pcDNA4 Myc/His APS wt, comme indiqué. Elles ont été privées en sérum et stimulées ou non par 30 ng/mL de PDGF-BB pendant 10 minutes. Les extraits cellulaires totaux (ECT) et les immunoprécipitations (IP) anti-SHP-2 ont été analysés par immunobuvardage (IB) Western. Le panneau du bas dans l'IB  $\alpha$ -pY sur l'IP correspond à une exposition de 15 secondes et, le panneau du haut, à une exposition d'une minute. La position et l'identité des marqueurs de poids moléculaire sont indiquées à la gauche du panneau du haut (trait, en kDa). La position de la phosphoprotéine pp95, de SHP-2, du PDGFR $\beta$  et de Myc-APS dans les IB  $\alpha$ -pY est indiquée. Ce résultat est représentatif de deux expériences indépendantes.

## **4. Discussion**

Pour étudier la fonction d'APS dans les étapes précoces des voies de signalisation du PDGFR $\beta$ , nous avons utilisé une approche d'expression transitoire de constituants de cette voie dans les fibroblastes 293.T. Plusieurs éléments de nos résultats appuient l'absence d'expression endogène du PDGFR $\alpha$  et du PDGFR $\beta$  dans ces cellules. Le PDGF-BB a la capacité d'activer les trois combinaisons dimériques possibles du PDGFR $\alpha$  et du PDGFR $\beta$ . Lorsque les 293.T ont été stimulées par le PDGF-BB, aucune autophosphorylation de récepteurs endogènes n'a été détectée par immunobuvardages Western (**Figures 7, 13A et 15**). De plus, aucune phosphorylation sur tyrosine de Myc-APS, de Flag-p85 $\alpha$  ni de SHP-2 n'a été détectée à la suite de leur immunoprécipitation à partir de cellules stimulées par le PDGF-BB (**Figures 7B, 13A, 15**). Par contre, lorsque le PDGFR $\beta$  a été transfecté, la stimulation des cellules par le PDGF-BB a permis la détection de l'autophosphorylation du PDGFR $\beta$  exogène ainsi que la phosphorylation sur tyrosine de Myc-APS, de Flag-p85 $\alpha$  et de SHP-2 (**Figures 7, 13 et 15**). Les résultats que nous avons obtenus s'appliquent donc aux voies de signalisation du PDGFR $\beta$ .

Il a été montré que pendant sa synthèse, le PDGFR $\beta$  subit des événements de *N*-glycosylation et d'*O*-glycosylation. Pendant la maturation de ces oligosaccharides dans le réticulum endoplasmique et dans l'appareil de Golgi, le poids moléculaire du PDGFR $\beta$  passe de 145 à 160 kDa puis à 180 kDa, la forme mature du récepteur (64). Il a été montré, *in vitro*, que ces précurseurs du PDGFR $\beta$  sont aussi capables de lier le PDGF-BB et d'être activés par ce dernier (64). D'ailleurs, leur autophosphorylation *in vivo* a pu être détectée à la suite de la stimulation de cellules par le PDGF-BB (65). Nos résultats appuient que les précurseurs immatures du PDGFR $\beta$  peuvent être activés *in vivo* à la suite de la stimulation des cellules par le PDGF-BB. En effet, l'association entre la sous-unité régulatrice p85 $\alpha$  de la PI3K et le PDGFR $\beta$  dépend de l'activation de ce dernier. Nous avons pu détecter la co-immunoprécipitation des précurseurs de 145 et 160 kDa autophosphorylés avec Flag-p85 $\alpha$ , appuyant leur activation *in vivo* (**Figure 13B**).

La diminution de la demi-vie du PDGFR $\beta$  à la suite de la liaison de son ligand a déjà été démontrée (70,71). Nous avons observé une diminution du signal du PDGFR $\beta$  total dans les extraits cellulaires totaux à la suite de la stimulation par le PDGF-BB (**Figure 7B**). Cette diminution pouvait être attribuable à une phosphosensibilité de l'anticorps utilisé et/ou à cet effet de diminution de la demie-vie du récepteur suite à la liaison de son ligand. De plus, il a déjà été montré que la liaison du PDGF-BB à son récepteur conduit à l'internalisation du PDGFR $\beta$  dans les endosomes (67), structures à partir desquelles il peut être recyclé à la membrane cellulaire ou dégradé. Cette dégradation peut survenir à la suite de la fusion des endosomes au compartiment lysosomal ou par la voie de dégradation protéolytique ubiquitine-protéasome (68-70). La polyubiquitination du PDGFR $\beta$  se détecte entre autres par l'apparition d'une traînée lorsqu'il est analysé par immunobuvardage Western (69). À la suite de la stimulation du PDGFR $\beta$ , nous avons pu détecter l'apparition d'une traînée pouvant être attribuée à sa dégradation par la voie ubiquitine-protéasome (**Figure 9**).

Nous avons tout d'abord voulu étudier davantage l'aspect moléculaire de l'interaction entre APS et le PDGFR $\beta$  *in vivo*. Il a été montré qu'APS est phosphorylée sur tyrosine à la suite de la stimulation des NIH 3T3 par le PDGF-AA et le PDGF-BB (16). Nous avons montré que la stimulation du PDGFR $\beta$  par son ligand conduit à la phosphorylation sur tyrosine de Myc-APS (**Figure 7**). Nous avons aussi montré que le PDGFR $\beta$  activé co-immunoprécipite *in vivo* avec Myc-APS (**Figures 9 et 10**). Nos résultats confirment donc qu'APS est un substrat du PDGFR $\beta$ . Il a aussi été démontré que la tyrosine 763 du PDGFR $\beta$  permet l'association *in vitro* d'APS (15). Nous avons confirmé, *in vivo*, le rôle de cette tyrosine du PDGFR $\beta$  dans l'interaction avec Myc-APS (**Figure 9**). En effet, nos résultats démontrent que la mutation de cette tyrosine 763 en phénylalanine diminue la co-immunoprécipitation du PDGFR $\beta$  avec Myc-APS à la suite de la stimulation par le PDGF-BB. Cependant, nous démontrons que cette tyrosine n'est pas le seul site d'interaction d'APS avec le PDGFR $\beta$ . En effet, la co-immunoprécipitation du PDGFR $\beta$  Y763F avec Myc-APS est toujours détectée. De plus, l'absence de changement dans l'intensité de la phosphorylation sur tyrosine de Myc-APS suite à l'activation du PDGFR $\beta$  wt ou du PDGFR $\beta$  Y763F montre que la

tyrosine 763 du PDGFR $\beta$  n'est pas essentielle à la phosphorylation sur tyrosine de Myc-APS. Cette observation suggère fortement que d'autres tyrosines du PDGFR $\beta$  permettent le recrutement d'APS et suffisent pour conduire à sa phosphorylation sur tyrosine.

Il a été proposé que la présence d'une isoleucine ou d'une leucine en position +3 d'une phosphotyrosine soit un déterminant de sa reconnaissance par le domaine SH2 d'APS (15). La tyrosine 763 du PDGFR $\beta$  correspond d'ailleurs à ce consensus. L'étude de la séquence intracellulaire du PDGFR $\beta$  a permis d'identifier d'autres tyrosines possédant cette caractéristique, soit les tyrosines 686, 800, 880, 904 et 914. Cependant, ces tyrosines sont localisées dans les domaines tyrosine kinase 1 et 2 du PDGFR $\beta$  et ne sont pas des sites d'autophosphorylation connus. De plus, il n'a jamais été montré que le PDGFR $\beta$  peut recruter des protéines à l'un ou à l'autre de ses deux domaines tyrosines kinases. Il semble donc peu probable que ces tyrosines possédant une leucine ou une isoleucine en position +3 puissent recruter APS. Il a aussi été montré que le domaine SH2 d'APS s'associe aux tyrosines 1158 et 1162 de la boucle d'activation du domaine tyrosine kinase de l'IR (8,12,13). Ces tyrosines ne possèdent pas de leucine ou d'isoleucine en position +3. Même si ces tyrosines de l'IR ne sont pas conservées dans la boucle d'activation du PDGFR $\beta$ , ces données démontrent que le domaine SH2 d'APS ne lie pas exclusivement des phosphotyrosines possédant une leucine ou une isoleucine en position +3. La suggestion d'autres tyrosines du PDGFR $\beta$  pouvant potentiellement permettre l'association d'APS ne peut donc se faire par déduction à l'aide des connaissances accumulées sur les caractéristiques de liaison du domaine SH2 d'APS.

Il a été montré que le domaine SH2 d'APS est suffisant à son interaction avec le PDGFR $\beta$  (16). Nos résultats suggèrent fortement qu'il est, de plus, essentiel à cette interaction et à la phosphorylation sur tyrosine d'APS dans les voies du PDGFR $\beta$ . Nous avons suggéré que l'arginine invariable du domaine SH2 d'APS est nécessaire à son association au PDGFR $\beta$  et à sa phosphorylation sur tyrosine (**Figure 10**). En effet, la phosphorylation résiduelle sur tyrosine de Myc-APS SH2 ko à la suite de l'activation du PDGFR $\beta$  peut s'expliquer par la co-immunoprécipitation résiduelle du récepteur avec ce mutant. Cette co-immunoprécipitation résiduelle du

PDGFR $\beta$  avec Myc-APS SH2 ko (R445K) s'explique par la similarité de charge et de structure entre les chaînes latérales de l'arginine et de la lysine. La documentation scientifique à propos de l'interaction d'APS avec l'IR appuie cette interprétation. En effet, il a été montré que la mutation de cette arginine en lysine ne détruit pas complètement l'interaction d'APS avec le récepteur de l'insuline (8), alors que sa mutation en alanine, changement drastique d'acide aminé provoquant une perte de charge, détruit complètement l'interaction d'APS avec l'IR (13). Nous pouvons donc suggérer que la mutation de l'arginine 445 en alanine empêchera complètement l'association d'APS avec le PDGFR $\beta$  ainsi que sa phosphorylation sur tyrosine à la suite de l'activation de ce récepteur. Il est donc très probable que le domaine SH2 d'APS est non seulement suffisant, mais aussi essentiel à son interaction avec le PDGFR $\beta$ . De même, le domaine SH2 d'APS est aussi fort probablement essentiel à sa phosphorylation sur tyrosine à la suite de l'activation du PDGFR $\beta$ .

À ce jour, aucune preuve d'une interaction directe d'APS avec le PDGFR $\beta$  n'a été apportée. Cependant, le PDGFR $\beta$  fait partie de la classe III des récepteurs tyrosines kinases, tout comme c-Kit. Or, APS a été identifiée par sa liaison directe à c-Kit dans un double hybride chez la levure (3). De plus, l'interaction directe du domaine SH2 de SH2-B $\beta$  avec le PDGFR a été montrée (45). Les domaines SH2 d'APS et de SH2-B possèdent 79% d'identité en acides aminés. Compte tenu de l'ensemble de ces données, il est fort probable qu'APS interagisse directement avec le PDGFR $\beta$ . Ceci pourrait être confirmé par un double hybride chez la levure ou encore par des techniques de transfert d'énergie par résonance comme le FRET (fluorescence resonance energy transfer) ou le BRET (bioluminescence resonance energy transfer). Il est aussi possible qu'une protéine tyrosine kinase cytosolique soit impliquée dans la phosphorylation sur tyrosine d'APS. En effet, il a été montré que l'activation d'un mutant du récepteur c-Kit ne pouvant plus interagir avec Myc-APS conduit tout de même à sa phosphorylation sur tyrosine *in vivo* (15). De plus, APS est un substrat de JAK1, JAK2 et de JAK3 (29), des PTK cytosoliques pouvant être activées par le PDGFR $\beta$  (136). Étant donné que nos résultats suggèrent que le domaine SH2 d'APS est essentiel à sa phosphorylation sur tyrosine dans les voies du PDGFR $\beta$ , l'association d'APS à une PTK cytosolique dans ces voies dépendrait aussi de son domaine SH2.

À la suite de son interaction avec le PDGFR $\beta$  activé, APS subit des modifications post-traductionnelles se manifestant par une modification de son poids moléculaire apparent sur SDS-PAGE (**Figures 7, 8 et 10**). Nos résultats montrent que la phosphorylation sur tyrosine de Myc-APS est une de ces modifications post-traductionnelles subies à la suite de l'activation du PDGFR $\beta$ . La seule tyrosine d'APS ayant été identifiée à ce jour comme étant un site de phosphorylation est la tyrosine 629. À l'aide de l'étude de la phosphorylation sur tyrosine de mutants ponctuels de Myc-APS à la suite de l'activation du PDGFR $\beta$ , nous avons montré que seul le mutant Myc-APS Y546F n'est pas phosphorylé sur tyrosine dans les extraits cellulaires totaux (**Figure 10**). Malgré la phosphorylation sur tyrosine de ce mutant pendant l'immunoprécipitation, le poids moléculaire apparent plus faible de la forme de Myc-APS Y546F reconnu par l'anticorps anti-phosphotyrosine confirme le retrait d'un site de modification post-traductionnelle à la suite de l'activation du PDGFR $\beta$ . APS est donc phosphorylée sur sa tyrosine 546 à la suite de l'activation du PDGFR $\beta$ . De ce fait, nous identifions un nouveau site de phosphorylation d'APS, conservé chez le rat et la souris.

À dix minutes de stimulation par le PDGF-BB, nos résultats démontrent que Myc-APS est principalement phosphorylée, dans les extraits cellulaires totaux, sur la tyrosine 546 (**Figure 10**). Pendant l'immunoprécipitation, une activité tyrosine kinase conduit cependant à la phosphorylation sur tyrosine de Myc-APS Y546F. L'ajout de PP2 au tampon de lyse n'empêche pas cette phosphorylation, excluant une participation des PTK de la famille de Src. Il est possible que l'activité PTK présente pendant l'immunoprécipitation soit attribuable à JAK1 ou JAK2, deux membres de la famille des JAK étant activées par le PDGFR $\beta$  et pouvant phosphoryler APS (29,137). Cependant, la détection du PDGFR $\beta$  actif dans l'immunoprécipitation propose que l'association du PDGFR $\beta$  avec Myc-APS Y546F soit responsable de la phosphorylation sur tyrosine survenant pendant l'immunoprécipitation. L'ajout d'un inhibiteur spécifique du PDGFR au tampon de lyse, comme le D-64406 ((5-Hydroxy-1H-2-indolyl)(1H-2-indolyl)-methanone, (138)), devrait donc empêcher cet événement de phosphorylation. Cette hypothèse propose cependant l'existence d'autres sites de phosphorylation sur tyrosine d'APS à la suite de l'activation du PDGFR $\beta$ . Il est possible que ces sites aient une cinétique de phosphorylation différente de la tyrosine 546, de sorte qu'à dix minutes de stimulation, leur mutation

ne produise pas de changement dans l'intensité de la phosphorylation sur tyrosine détectée. L'étude de la phosphorylation sur tyrosine des mutants de Myc-APS à différents temps de stimulation du PDGFR $\beta$  pourrait aider à l'identification de ces sites secondaires. De plus, l'ajout de D-64406 au tampon de lyse, en inhibant l'activité tyrosine kinase durant l'immunoprécipitation, permettra de détecter les variations réelles de niveau de phosphorylation sur tyrosine des différents mutants de Myc-APS. Par la combinaison des mutations des tyrosines ainsi identifiées, les sites de phosphorylation d'APS par le PDGFR $\beta$  activé pourront être confirmés.

L'immunobuvardage anti-Myc sur les extraits cellulaires totaux démontre que Myc-APS Y546F, malgré l'absence de phosphorylation sur tyrosine, a subi d'autres modifications post-traductionnelles, suggérant qu'APS soit phosphorylée sur sérine/thréonine dans les voies du PDGFR $\beta$  (**Figure 10D**). D'ailleurs, la sérine 598 de hAPS est dans un consensus de phosphorylation par Akt ( $^R/K-X-^R/K-XX-S/T$ , (139)), une source possible de phosphorylation d'APS. De plus, son patron de migration rappelle celui de SH2-B à la suite de sa phosphorylation sur sérine et thréonine, entre autres par les kinases de la voie MAPK Erk activées par le NGF (53). De plus, la phosphorylation sur sérine/thréonine de SH2-B $\beta$  dans les voies du PDGF a déjà été montrée (45). Comme une certaine redondance fonctionnelle entre les deux protéines a déjà été établie (17), les modifications post-traductionnelles d'APS dans les voies du PDGFR $\beta$  incluent fort probablement la phosphorylation sur sérine/thréonine.

L'identification d'un nouveau site de phosphorylation sur tyrosine d'APS suggère une fonction de protéine adaptatrice variable selon le récepteur activé. Il a été montré que la phosphorylation de la tyrosine 629 d'APS par le récepteur de l'insuline crée un site de recrutement de Cbl. La phosphorylation de la tyrosine 546 par le PDGFR $\beta$  propose une autre fonction d'APS dans les voies de ce récepteur. Nous avons montré que la phosphorylation sur tyrosine d'une protéine d'environ 95 kDa par le PDGFR $\beta$  dans l'immunoprécipitation de SHP-2 est permise par l'expression d'APS (**Figure 15**). Il sera intéressant de tester la nécessité de la phosphorylation d'APS sur sa tyrosine 546 dans la phosphorylation de cette protéine. Si Myc-APS Y546F ne peut plus permettre la détection de cette phosphoprotéine dans l'immunoprécipitation de SHP-2, cela démontrera que la

tyrosine 546 est, elle aussi, un site de recrutement de protéines possédant un domaine SH2. Dépendamment de la tyrosine d'APS phosphorylée, les complexes de signalisation qui seront formés varieront donc possiblement d'un récepteur membranaire à un autre.

Il a été montré qu'APS est un oligomère constitutif *in vivo* (55). La dimérisation constitutive du domaine SH2 d'APS permet de détecter son oligomérisation *in vitro* (3) et *in vivo* (13). La dimérisation du domaine SH2 de rAPS est compromise par le remplacement du tryptophane hydrophobe conservé de l'hélice  $\alpha$  C-terminale par une histidine (13). Nos résultats démontrent que le tryptophane 483 du domaine SH2 de hAPS n'est pas essentiel à son oligomérisation constitutive *in vivo* (**Figure 11**). En effet, Myc-APS W483H co-immunoprécipite avec Flag-APS W483H. Il est donc possible que la mutation de ce tryptophane de hAPS, contrairement à rAPS, ne détruise pas la dimérisation du domaine SH2. Cette hypothèse pourra être vérifiée en étudiant la co-immunoprécipitation de Myc-APS 1-632 W483H avec le domaine SH2 W483H, isolé et étiqueté avec Flag. Ce résultat suggère aussi qu'il existe d'autres déterminants d'oligomérisation dans la structure d'APS. Parmi les candidats potentiels, il est possible que son domaine N-terminal et que sont domaine PH soient impliqués. Il a été montré que SH2-B existe elle aussi en oligomère constitutif *in vivo* (55). À l'aide de mutants tronqués de SH2-B, il a été montré que son domaine N-terminal est nécessaire et suffisant pour obtenir son oligomérisation. De plus, son domaine N-terminal est essentiel à la fonction physiologique de SH2-B, suggérant que son oligomérisation est essentielle à sa fonction. L'importance du domaine N-terminal d'APS dans son oligomérisation n'a pas été étudiée. Par contre, il a été rapporté que l'ablation de son domaine N-terminal empêche l'inhibition de l'activité transcriptionnelle de STAT5 par APS dans les voies du récepteur de l'érythropoïétine (7). Ces éléments suggèrent donc la possibilité que le domaine N-terminal d'APS soit impliqué dans son oligomérisation *in vivo* et que celle-ci soit nécessaire à sa fonction physiologique. L'autre domaine d'APS candidat pour permettre son oligomérisation est le domaine PH. En effet, il a été montré que le domaine PH d'Akt est un déterminant suffisant et essentiel de son oligomérisation (140). L'étude de l'implication du domaine N-terminal et du domaine PH d'APS dans son oligomérisation constitutive *in vivo* pourra être effectuée en vérifiant si Myc-APS 1-632 co-immunoprécipite avec chacun de ces domaines,

isolés et étiquetés avec Flag. À l'aide de ces renseignements, il sera possible d'obtenir un mutant d'APS dans lequel tous les déterminants de son oligomérisation seront modifiés de façon à l'empêcher. Ce mutant pourra servir à l'étude de l'importance fonctionnelle de l'oligomérisation constitutive *in vivo* d'APS, par exemple dans les voies du PDGFR $\beta$ .

Dans un deuxième temps, nous avons voulu caractériser la fonction d'APS dans les voies de signalisation du PDGFR $\beta$ . Pour ce faire, nous avons procédé à un criblage de partenaires possibles d'interaction d'APS hyperphosphorylée par GST-SH2 pull down. Nous avons démontré que l'hyperphosphorylation de Myc-APS dans les 293.T traitées au pervanadate permet son association avec les deux domaines SH2 de p85 $\alpha$  (**Figure 12**). Ce résultat suggère que la phosphorylation d'APS par des PTK exprimées dans les 293.T permet son association à p85 $\alpha$ . Ce résultat peut sembler paradoxal avec le fait que nous n'avons pu détecter de co-immunoprécipitation entre Myc-APS et Flag-p85 $\alpha$  dans les voies du PDGFR $\beta$ . Ce paradoxe peut être résolu par l'existence d'une ou plusieurs tyrosines d'APS n'étant pas phosphorylées à la suite de l'activation du PDGFR $\beta$  mais étant phosphorylées par le traitement au pervanadate. Cette optique suggère que la co-immunoprécipitation d'APS et de p85 $\alpha$  soit possible dans d'autres voies de signalisation permettant la phosphorylation de la ou des tyrosines phosphorylées suite au traitement par le pervanadate. Il est probable que ce paradoxe aurait pu être évité par une stimulation par le PDGF-BB du PDGFR $\beta$  co-transfecté avec Myc-APS.

Nos résultats suggèrent fortement une fonction d'APS dans la régulation négative de l'activité PI3K dans les voies de signalisation du PDGFR $\beta$ . Nos résultats démontrent l'existence de trois niveaux possibles de régulation, premièrement par la diminution de l'association de p85 $\alpha$  avec le PDGFR $\beta$ , deuxièmement par la diminution de la phosphorylation sur tyrosine de p85 $\alpha$  dans les voies du PDGFR $\beta$  et troisièmement dans la diminution de l'association de SHP-2 avec p85 $\alpha$  à la suite de l'activation du PDGFR $\beta$  (**Figures 13 et 14**). Chacun de ces effets de l'expression d'APS dans les voies du PDGFR $\beta$  permet, en accord avec la documentation scientifique, de proposer qu'APS diminue l'activation de la PI3K par le PDGFR $\beta$ .

Il a été montré que la relocalisation de la sous-unité catalytique p110 de la PI3K du cytosol vers la membrane par son association à des protéines membranaires conduit à l'augmentation de l'activité PI3K cellulaire. De plus, la liaison de phosphotyrosines présentes, par exemple, sur un RTK, par les deux domaines SH2 de la sous-unité régulatrice p85 $\alpha$  augmente davantage l'activation de la PI3K (134,141,142). Nous montrons que la co-expression d'APS diminue la co-immunoprécipitation du PDGFR $\beta$  avec Flag-p85 $\alpha$ , alors que l'activation du PDGFR $\beta$  dans les extraits cellulaires totaux est comparable (**Figure 13B**). Ceci démontre que la diminution d'interaction entre la sous-unité régulatrice p85 $\alpha$  et le PDGFR $\beta$  ne dépend pas de la diminution de l'activation du récepteur, mais plutôt d'une diminution de l'association de p85 $\alpha$  avec le récepteur. Ceci suggère la diminution de la relocalisation de la PI3K vers la membrane ainsi que la diminution de la liaison de phosphotyrosines par p85 $\alpha$ , appuyant, par le fait même, que la co-expression d'APS conduit à une diminution de l'activation de la PI3K par le PDGFR $\beta$ . En microscopie à fluorescence indirecte, il devrait donc être possible de démontrer que, dans les 293.T exprimant APS, la relocalisation de la PI3K à la membrane cellulaire à la suite de l'activation du PDGFR $\beta$  est plus faible qu'en l'absence d'APS.

Il a été montré que p85 $\alpha$  est recrutée aux tyrosines 740 et 751 du PDGFR $\beta$  par ses deux domaines SH2 (56,87,88). Nos résultats appuient qu'APS est recrutée par son domaine SH2 à la tyrosine 763 du PDGFR $\beta$  (**Figure 9**). Étant donné que ces tyrosines sont toutes localisées dans la même région et qu'aucune interaction de Myc-APS et Flag-p85 $\alpha$  n'a été détectée, nous proposons que la diminution du recrutement de p85 $\alpha$  au PDGFR $\beta$  lorsque APS est co-exprimée soit la conséquence d'une compétition indirecte par encombrement stérique des deux protéines. Cette hypothèse implique que la tyrosine 763 du PDGFR $\beta$  est essentielle pour qu'APS puisse diminuer l'association de p85 $\alpha$  au PDGFR $\beta$ . Cette hypothèse pourra être vérifiée en comparant l'association de Flag-p85 $\alpha$  avec le PDGFR $\beta$  sauvage et Y763F en présence et en absence d'APS.

Nos résultats suggèrent donc un premier niveau de régulation négative de l'activation de la PI3K dans les voies du PDGFR $\beta$  par APS à la suite d'une compétition de liaison au récepteur par un encombrement stérique entre p85 $\alpha$  et APS. Nos résultats démontrent que la diminution de l'association de p85 $\alpha$  au PDGFR $\beta$  est en corrélation avec une diminution de sa phosphorylation sur tyrosine (**Figure 13B**). Nos résultats suggèrent donc que cet encombrement stérique soit impliqué dans la diminution de la phosphorylation sur tyrosine de p85 $\alpha$  dans les voies du PDGFR $\beta$ . Cette diminution de la phosphorylation sur tyrosine de p85 $\alpha$  définit un deuxième niveau possible de régulation négative de l'activation de la PI3K par APS dans les voies du PDGFR $\beta$ . Il a été montré que le PDGFR $\beta$  phosphoryle p85 $\alpha$  sur la tyrosine 508 (89). Le mutant p85 $\alpha$  Y508F ne démontre aucune modification quant à l'activité PI3K associée. Cependant, au moins un autre site de phosphorylation sur tyrosine *in vivo* par le PDGFR $\beta$  existe (89). Parmi les sites de phosphorylation *in vivo* de p85 $\alpha$  rapportés, la phosphorylation de la tyrosine 688 joue un rôle dans l'activation de la PI3K (130). Il a été montré que la phosphorylation de cette tyrosine, située dans le domaine C-SH2 de p85 $\alpha$ , permet une interaction intramoléculaire avec le domaine N-SH2 qui conduit à l'activation de la PI3K. Il est donc possible que la diminution de la phosphorylation sur tyrosine de p85 $\alpha$  par le PDGFR $\beta$  lors de la co-expression d'APS diminue l'activation de la PI3K. La diminution de la phosphorylation sur tyrosine de p85 $\alpha$  lorsque APS est co-exprimée peut donc être un second niveau de régulation négative par APS de l'activation de la PI3K dans les voies du PDGFR $\beta$ .

Il serait intéressant de confirmer que la tyrosine 688 de p85 $\alpha$  est un second site de phosphorylation sur tyrosine par le PDGFR $\beta$ . Pour ce faire, nous suggérons de comparer les cartes de migration bidimensionnelle des phosphopeptides de p85 $\alpha$  sauvage et Y688F, à la suite de leur phosphorylation *in vivo* par le PDGFR $\beta$  et de leur trypsination. Si la tyrosine 688 est phosphorylée *in vivo* à la suite de l'activation du PDGFR $\beta$ , sa mutation devrait entraîner la disparition d'au moins un des phosphopeptides. Il sera aussi intéressant de vérifier si, à cause de la co-expression d'APS, la phosphorylation du phosphopeptide contenant la tyrosine 688 diminue suite à l'activation du PDGFR $\beta$ .

L'importance de SHP-2 pour l'activation de la voie PI3K/Akt et l'inhibition consécutive de l'apoptose a été montrée dans les voies de l'EGF, de l'IGF-1, du PDGF et de v-Src (118-120). Alors que la co-immunoprécipitation de SHP-2 et de p85 $\alpha$  a été montrée dans les voies du GM-CSF, de l'IL-2, de l'IL-3 et de l'EGF (119,122,123), elle n'a jamais été montrée dans les voies du PDGFR $\beta$ . Nos résultats démontrent que l'activation du PDGFR $\beta$  induit la co-immunoprécipitation de SHP-2 avec Flag-p85 $\alpha$  (**Figure 14**). Nos résultats supportent que l'association de SHP-2 avec Flag-p85 $\alpha$  dépende uniquement de la phosphorylation sur tyrosine de Flag-p85 $\alpha$  par le PDGFR $\beta$ . Tout d'abord, nous montrons que l'activation du PDGFR $\beta$  conduit à l'apparition d'un doublet de SHP-2, la bande de poids moléculaire apparent supérieur étant phosphorylée sur tyrosine (**Figure 14**). Nous détectons la co-immunoprécipitation des deux bandes de SHP-2 avec Flag-p85 $\alpha$ , montrant que la phosphorylation sur tyrosine de SHP-2 n'est pas essentielle à cette interaction. Aussi, nous montrons que la co-expression de Myc-APS diminue la co-immunoprécipitation de SHP-2 avec Flag-p85 $\alpha$  (**Figure 14**). Or, la co-expression de Myc-APS ne change pas le niveau de phosphorylation sur tyrosine de SHP-2, mais diminue la phosphorylation sur tyrosine de Flag-p85 $\alpha$  (**Figures 13 et 15**). Il semble donc que l'interaction entre SHP-2 et Flag-p85 $\alpha$  dépende du niveau de phosphorylation sur tyrosine de Flag-p85 $\alpha$ . Ainsi, nos résultats démontrent que les déterminants de l'association de SHP-2 et de p85 $\alpha$  dans les voies du PDGFR $\beta$  sont la phosphorylation sur tyrosine de p85 $\alpha$  et sa liaison par un ou les deux domaines SH2 de SHP-2.

Nos résultats, en parallèle avec la documentation scientifique, appuient aussi que l'interaction de SHP-2 avec p85 $\alpha$  soit l'explication moléculaire à l'importance de SHP-2 dans l'activation de la voie PI3K/Akt. Lorsque l'association de SHP-2 avec le PDGFR $\beta$  est empêchée par la mutation de tyrosines du PDGFR $\beta$ , l'activation de la PI3K n'est pas compromise (121). Or, dans de telles conditions, SHP-2 n'est pas phosphorylée sur tyrosine, mais son association à d'autres protéines par ses domaines SH2 n'est pas empêchée. Plusieurs études utilisent un mutant tronqué de SHP-2 n'ayant plus de domaine N-SH2 pour montrer que SHP-2 est impliquée dans l'activation de la voie PI3K/Akt (118,119). L'ablation d'un domaine SH2 de SHP-2 empêche son recrutement à ses partenaires d'interaction. En somme, l'interaction

de SHP-2 avec le PDGFR $\beta$  et sa phosphorylation sur tyrosine ne sont pas nécessaires à sa fonction dans la voie PI3K/Akt, mais son domaine N-SH2 est essentiel. Or, nous démontrons que l'interaction entre SHP-2 et p85 $\alpha$  implique au moins un domaine SH2 de SHP-2. Bref, lorsque l'interaction de SHP-2 avec p85 $\alpha$  est empêchée, SHP-2 ne régule plus l'activité PI3K. La somme de ces informations fournit par le fait même une base moléculaire pour expliquer l'importance de SHP-2 dans la régulation de l'activité PI3K dans les voies du PDGFR $\beta$ . Il semble en effet probable que l'association de SHP-2 à la sous-unité régulatrice p85 $\alpha$  est responsable, au moins en partie, de l'importance de SHP-2 pour l'activation de la PI3K dans les voies du PDGFR $\beta$ . Notons que lorsque SHP-2 ne peut plus interagir avec le PDGFR $\beta$  à cause de mutations des tyrosines la recrutant, son domaine phosphatase n'est pas activé (114), suggérant que l'activité catalytique de SHP-2 n'est pas nécessaire à sa fonction dans la régulation de l'activité PI3K.

Un troisième et dernier niveau possible de régulation négative de l'activation de la PI3K par APS est donc démontré par la diminution de la co-immunoprécipitation de SHP-2 avec Flag-p85 $\alpha$  dans les voies du PDGFR $\beta$ . En effet, lorsque APS est co-exprimée, la co-immunoprécipitation de SHP-2 avec p85 $\alpha$  dans les voies du PDGFR $\beta$  est diminuée (**Figure 14**). La diminution de la phosphorylation sur tyrosine de p85 $\alpha$  par la co-expression d'APS peut donc avoir un effet sur l'activité PI3K en modulant l'interaction de SHP-2 avec p85 $\alpha$ . Notons, malgré le fait qu'APS et SHP-2 soient toutes deux recrutées à la tyrosine 763 du PDGFR $\beta$ , l'absence de diminution de phosphorylation sur tyrosine de SHP-2 lorsque APS est co-exprimée (**Figure 15**). Ceci s'explique par le fait que SHP-2 s'associe aussi avec une autre tyrosine du PDGFR $\beta$ , la tyrosine 1009 (113). Ainsi, APS ne peut pas entrer en compétition avec SHP-2 pour son association au récepteur activé. Il pourrait donc être attendu que leur co-immunoprécipitation soit permise par leur recrutement simultané au PDGFR $\beta$ , ce qui n'a pas été détecté. Il est possible qu'APS et SHP-2 interagissent avec des fractions distinctes du PDGFR $\beta$ . Il est aussi probable, étant donné la faible quantité de PDGFR $\beta$  co-immunoprécipité avec Myc-APS, que l'interaction d'APS avec le PDGFR $\beta$  soit transitoire et ne permette pas la co-immunoprécipitation de SHP-2 et d'APS.

Nos résultats permettent donc de proposer un mécanisme par lequel APS peut diminuer l'activation de la PI3K dans les voies du PDGFR $\beta$ . Premièrement, dans ce modèle, le recrutement d'APS à la tyrosine 763 du PDGFR $\beta$  produit un encombrement stérique interférant avec le recrutement de p85 $\alpha$  aux tyrosines 740 et 751 du PDGFR $\beta$ . Cette diminution de la relocalisation membranaire de la PI3K et de l'association des deux domaines SH2 de p85 $\alpha$  au récepteur est un premier niveau de régulation par APS de l'activation de la PI3K par le PDGFR $\beta$ . Deuxièmement, la diminution de l'association de p85 $\alpha$  avec le PDGFR $\beta$  conduit aussi à la diminution de sa phosphorylation sur tyrosine. Il est probable que cette diminution de phosphorylation affecte une tyrosine régulant la PI3K, comme par exemple, la tyrosine 688. Troisièmement, la diminution de la phosphorylation sur tyrosine de p85 $\alpha$  lors de la co-expression d'APS diminue son association avec SHP-2. Plusieurs éléments de preuves permettent de croire que l'effet positif de SHP-2 sur l'activation de la PI3K dans les voies du PDGFR $\beta$  dépend de cette interaction. Donc, APS joue potentiellement un rôle négatif sur l'activation de la PI3K par le PDGFR $\beta$  à trois niveaux de régulation différents.

La co-immunoprécipitation réciproque entre Myc-APS et Flag-p85 $\alpha$  ainsi qu'entre Myc-APS et SHP-2 n'a pas été détectée. Il semble donc qu'APS n'interagit pas avec ces protéines pour conduire aux effets observés. Ceux-ci découlent donc probablement tous de la compétition par encombrement stérique entre APS et p85 $\alpha$  pour leur association au PDGFR $\beta$ . Si tel est le cas, la co-expression de Myc-APS SH2 ko devrait empêcher APS de produire ces effets et, au contraire, la co-expression de Myc-APS Y546F ne devrait pas influencer les effets observés. Il sera donc intéressant, dans le but de confirmer le mécanisme proposé, de comparer les effets de Myc-APS wt, SH2 ko et Y546F sur les effets étudiés, soit la diminution de l'association de p85 $\alpha$  au PDGFR $\beta$ , la diminution de la phosphorylation sur tyrosine de p85 $\alpha$  à la suite de l'activation du PDGFR $\beta$  et la diminution de l'association de SHP-2 avec p85 $\alpha$  dans les voies du PDGFR $\beta$ . De plus, la notion de compétition implique que l'effet d'APS sur le recrutement de p85 $\alpha$  dépendra du récepteur activé, la condition d'encombrement stérique entre p85 $\alpha$  et APS devant être respectée. Cette condition implique que, par exemple, APS n'aurait probablement pas d'effet

sur le recrutement de p85 $\alpha$  à c-Kit. En effet, il a été montré que les tyrosines 568 et 936 de c-Kit sont essentielles à l'association d'APS au récepteur (15) et que c'est la tyrosine 719 de c-Kit qui est essentielle au recrutement de la PI3K (143,144). À la condition que ces tyrosines ne soient pas rapprochées par la structure tertiaire du récepteur, la possibilité d'un encombrement stérique est éliminée. L'absence d'un effet de la co-expression d'APS sur l'association de p85 $\alpha$  à c-Kit appuierait davantage notre interprétation des résultats et le mécanisme proposé.

Si APS semble jouer un rôle indirect dans la régulation de l'association de p85 $\alpha$  au PDGFR $\beta$ , dans la phosphorylation sur tyrosine de p85 $\alpha$  et dans l'association de SHP-2 avec p85 $\alpha$  dans les voies du PDGFR $\beta$ , nos résultats suggèrent aussi une fonction directe d'APS comme protéine adaptatrice dans ces voies. En effet, nous avons montré que la phosphorylation sur tyrosine d'une protéine d'environ 95 kDa, qui n'est pas Gab2, à la suite de l'activation du PDGFR $\beta$  dépend de l'expression d'APS (**Figure 15**). En effet, cette phosphoprotéine n'est détectée, dans les immunoprécipitations anti-SHP-2, que lorsque APS est exprimée. Comme APS est absente du complexe immunoprécipité, ce n'est pas le recrutement de cette protéine à SHP-2 qui est permis par APS, mais plutôt sa phosphorylation sur tyrosine. Ce résultat suggère donc qu'APS est une protéine adaptatrice permettant la phosphorylation de cette protéine dans les voies du PDGFR $\beta$ . Afin d'éclaircir le mécanisme par lequel APS permettrait la phosphorylation de cette protéine, il serait intéressant de voir si la co-expression de Myc-APS wt, SH2 ko et Y546F modifie la présence de cette phosphoprotéine dans le complexe immunoprécipité avec SHP-2. Si APS joue réellement un rôle de protéine adaptatrice pour le recrutement de cette protéine au PDGFR $\beta$ , on peut s'attendre à ce que l'inactivation du recrutement d'APS au PDGFR $\beta$  (SH2 ko) ainsi que le retrait du site principal de phosphorylation d'APS par le PDGFR $\beta$  (Y546F) empêche la détection de cette pp95.

Il sera aussi intéressant de répéter nos résultats et de confirmer le mécanisme que nous proposons dans un modèle cellulaire exprimant au niveau endogène les voies de signalisation du PDGFR $\beta$ , comme les NIH 3T3. Ce modèle pourra de plus servir à la confirmation de la régulation négative de l'activation de la PI3K dans les voies de signalisation du PDGFR $\beta$  lors de la co-expression d'APS. Cette diminution de

l'activité PI3K conduirait à la diminution de diverses réponses de ces cellules au PDGF-BB, comme les signaux de survie, la croissance, la transformation cellulaire et la réorganisation du cytosquelette d'actine pour la migration cellulaire. Pour vérifier la diminution de l'activation de la PI3K par le PDGFR $\beta$  lorsqu'APS est co-exprimée, nous suggérons de quantifier l'activation d'une enzyme en aval de la PI3K, comme Akt, le médiateur des effets anti-apoptotiques de la PI3K. Akt est une sérine/thréonine kinase dont l'activité enzymatique, régulée par la PI3K, conduit à la phosphorylation et à l'inhibition de diverses protéines (82,145). Nous proposons de doser, par immunobuvardage Western à l'aide d'anticorps phosphospécifiques, le niveau de phosphorylation *in vivo* d'un substrat d'Akt. Par exemple, il est possible de doser le niveau de phosphorylation de la sérine 9 de la GSK-3 $\beta$ , un substrat physiologique bien caractérisé d'Akt (146,147).

La position centrale d'Akt dans le contrôle de réponses cellulaires importantes, comme l'inhibition de l'apoptose, fait d'elle un proto-oncogène. À l'origine, il a été montré que la forme virale constitutivement active v-Akt induit la formation de tumeurs chez les souris « nude » (148). L'amplification des gènes AKT1 et AKT2 chez l'humain a été retrouvée dans des carcinomes ovariens ainsi que dans des adénocarcinomes gastriques (149,150). L'activation d'Akt a aussi été démontrée comme faisant partie du processus de formation et d'invasion des tumeurs de la glande thyroïde (151). Il a aussi été montré que l'activation d'Akt, en permettant aux cellules cancéreuses d'échapper à l'apoptose, est en corrélation avec l'agressivité des tumeurs et la résistance de celles-ci à la chimiothérapie (152). En effet, plusieurs agents chimiothérapeutiques agissent en induisant l'apoptose. Il a été montré que l'activation d'Akt promeut la tumorigénèse et la résistance à ces agents (153). À la lumière de ces informations, il est peu surprenant qu'Akt soit une cible potentielle majeure dans le développement de nouvelles thérapies contre le cancer (154).

Le rôle du PDGFR $\beta$  dans la transformation cellulaire est bien connu. Sa stimulation par un mécanisme autocrine serait d'ailleurs une étape limitante dans la genèse de certains cancers, comme les gliomes et les sarcomes. Comme nos résultats suggèrent qu'APS diminue l'activation de la PI3K dans les voies de ce récepteur, il est possible que l'expression d'APS diminue l'activité de la voie PI3K/Akt dans les

tissus exprimant le PDGFR $\beta$ . Ceci impliquerait alors que ces tissus seraient plus sensibles à l'apoptose et moins sujets à développer des tumeurs agressives, invasives et résistantes aux agents chimiothérapeutiques. Il pourrait donc être intéressant de regarder la corrélation entre l'expression d'APS et les caractéristiques des tissus sains et cancéreux co-exprimant le PDGFR $\beta$ .

## **5. Conclusion**

Nos résultats confirment qu'APS est un substrat du PDGFR $\beta$ . Nous avons aussi caractérisé davantage l'interaction d'APS avec le PDGFR $\beta$ . Nous avons confirmé que la tyrosine 763 du PDGFR $\beta$  est un site d'association d'APS *in vivo*. Cependant, l'association d'APS à la tyrosine 763 du PDGFR $\beta$  n'est pas essentielle à la phosphorylation sur tyrosine d'APS. Nous démontrons ainsi l'existence d'autres sites d'association d'APS avec le PDGFR $\beta$ . Il a déjà été montré que le domaine SH2 d'APS est suffisant pour l'interaction avec le PDGFR $\beta$ . Nos résultats suggèrent fortement que le domaine SH2 d'APS est, de plus, essentiel à son association au récepteur. En outre, le domaine SH2 d'APS est aussi fort probablement essentiel à sa phosphorylation sur tyrosine à la suite de l'activation du PDGFR $\beta$ . Nous avons aussi identifié la tyrosine 546 d'APS comme étant un site principal de phosphorylation sur tyrosine à la suite de l'activation du PDGFR $\beta$ . De ce fait, nous rapportons l'identification d'un nouveau site de phosphorylation sur tyrosine d'APS. Cette donnée suggère que la fonction de protéine adaptatrice d'APS puisse varier selon les voies de signalisation, dépendamment de la tyrosine phosphorylée. Nos résultats démontrent que l'activation du PDGFR $\beta$  entraîne plusieurs modifications post-traductionnelles d'APS, suggérant des événements de phosphorylation sur sérine/thréonine. Nous montrons que la phosphorylation sur tyrosine d'APS n'est pas essentielle à ces modifications. Il a été montré que la dimérisation du domaine SH2 d'APS est suffisante pour permettre l'oligomérisation constitutive d'APS *in vivo*. Nos résultats suggèrent cependant que la dimérisation du domaine SH2 d'APS n'est pas essentielle à cette oligomérisation. Nous proposons donc l'existence d'autres déterminants d'oligomérisation chez APS.

Nous avons par la suite caractérisé d'avantage la fonction d'APS dans les voies du PDGFR $\beta$ . Nous avons débuté ce volet par l'identification de partenaires d'interaction possibles d'APS. Nous avons montré qu'APS hyperphosphorylée interagit *in vitro* avec les deux domaines SH2 de la sous-unité régulatrice p85 $\alpha$  de la PI3K. Nos résultats démontrent que la co-expression d'APS conduit à une diminution de l'association de p85 $\alpha$  avec le PDGFR $\beta$ . Il est probable que cet effet soit dû à une compétition indirecte, par encombrement stérique entre les deux protéines, pour leur association au PDGFR $\beta$ . Nous montrons aussi que la co-expression d'APS

diminue la phosphorylation sur tyrosine de p85 $\alpha$  à la suite de l'activation du PDGFR $\beta$ , probablement à cause de la diminution de son association au PDGFR $\beta$ . Nous démontrons l'existence d'une nouvelle interaction protéique dans les voies du PDGFR $\beta$ . En effet, nous montrons que SHP-2 et p85 $\alpha$  s'associent dans les voies de ce récepteur et que cette association est dépendante de la phosphorylation sur tyrosine de p85 $\alpha$ . La co-expression d'APS, en diminuant la phosphorylation sur tyrosine de p85 $\alpha$ , module donc négativement l'association de SHP-2 avec p85 $\alpha$ . Il a été montré que l'activation de la PI3K dépend de sa relocalisation à la suite de son association avec des protéines membranaires et que l'association des domaines SH2 de p85 $\alpha$  à des phosphotyrosines augmente son activité. Il a aussi été montré que la phosphorylation de certaines tyrosines de p85 $\alpha$  permet l'activation de la PI3K. De plus, plusieurs éléments appuient que l'association de SHP-2 à p85 $\alpha$  permette un effet positif de SHP-2 sur l'activation de la PI3K. Nos résultats suggèrent donc qu'APS module de façon négative l'activation de la PI3K dans les voies du PDGFR $\beta$ . Cette modulation négative de la PI3K est candidate pour jouer un rôle physiologique important dans le processus de tumorigénèse dépendant du PDGFR $\beta$ . En effet, la PI3K contrôle les signaux de survie cellulaire par la modulation de l'activité du proto-oncogène Akt, dont l'activation permet aux cellules cancéreuses d'esquiver l'apoptose. En plus de ces effets sur p85 $\alpha$ , nos résultats démontrent aussi qu'APS a une fonction de protéine adaptatrice dans les voies du PDGFR $\beta$ . En effet, nous démontrons qu'une phosphoprotéine d'environ 95 kDa n'est détectée dans les immunoprécipitations contre SHP-2 que lorsque APS est exprimée. APS n'est pas détectée dans le complexe immunoprécipité. Ceci exclue donc qu'APS permette son association à SHP-2 et suggère plutôt que la phosphorylation de cette protéine soit permise par l'expression d'APS, impliquant un rôle de protéine adaptatrice d'APS dans les voies du PDGFR $\beta$ . Mis ensembles, nos résultats démontrent un rôle de la protéine adaptatrice APS dans les voies de signalisation du PDGFR $\beta$  et suggèrent une fonction dans la régulation de l'activité PI3K dans cette voie.

## **Bibliographie**

1. Neel, B. G.; Gu, H., and Pao, L. *The 'Shp'ing news: SH2 domain-containing tyrosine phosphatases in cell signaling*. Trends Biochem Sci. 2003 Jun; 28(6):284-93.
2. Pawson, T.; Raina, M., and Nash, P. *Interaction domains: from simple binding events to complex cellular behavior*. FEBS Lett. 2002 Feb 20; 513(1):2-10.
3. Yokouchi, M.; Suzuki, R.; Masuhara, M.; Komiya, S.; Inoue, A., and Yoshimura, A. *Cloning and characterization of APS, an adaptor molecule containing PH and SH2 domains that is tyrosine phosphorylated upon B-cell receptor stimulation*. Oncogene. 1997 Jul 3; 15(1):7-15.
4. Lemmon, M. A. and Ferguson, K. M. *Signal-dependent membrane targeting by pleckstrin homology (PH) domains*. Biochem J. 2000 Aug 15; 350 Pt 1:1-18.
5. Pawson, T. *Specificity in signal transduction: from phosphotyrosine-SH2 domain interactions to complex cellular systems*. Cell. 2004 Jan 23; 116(2):191-203.
6. Mayer, B. J. *SH3 domains: complexity in moderation*. J Cell Sci. 2001 Apr; 114(Pt 7):1253-63.
7. Wakioka, T.; Sasaki, A.; Mitsui, K.; Yokouchi, M.; Inoue, A.; Komiya, S., and Yoshimura, A. *APS, an adaptor protein containing Pleckstrin homology (PH) and Src homology-2 (SH2) domains inhibits the JAK-STAT pathway in collaboration with c-Cbl*. Leukemia. 1999 May; 13(5):760-7.
8. Moodie, S. A.; Alleman-Sposeto, J., and Gustafson, T. A. *Identification of the APS protein as a novel insulin receptor substrate*. J Biol Chem. 1999 Apr 16; 274(16):11186-93.

9. Minami, A.; Iseki, M.; Kishi, K.; Wang, M.; Ogura, M.; Furukawa, N.; Hayashi, S.; Yamada, M.; Obata, T.; Takeshita, Y.; Nakaya, Y.; Bando, Y.; Izumi, K.; Moodie, S. A.; Kajiura, F.; Matsumoto, M.; Takatsu, K.; Takaki, S., and Ebina, Y. *Increased insulin sensitivity and hypoinsulinemia in APS knockout mice*. *Diabetes*. 2003 Nov; 52(11):2657-65.
10. Liu, J.; Kimura, A.; Baumann, C. A., and Saltiel, A. R. *APS facilitates c-Cbl tyrosine phosphorylation and GLUT4 translocation in response to insulin in 3T3-L1 adipocytes*. *Mol Cell Biol*. 2002 Jun; 22(11):3599-609.
11. Iseki, M.; Takaki, S., and Takatsu, K. *Molecular cloning of the mouse APS as a member of the Lnk family adaptor proteins*. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000 May 27; 272(1):45-54.
12. Ahmed, Z.; Smith, B. J.; Kotani, K.; Wilden, P., and Pillay, T. S. *APS, an adapter protein with a PH and SH2 domain, is a substrate for the insulin receptor kinase*. *Biochem J*. 1999 Aug 1; 341 ( Pt 3):665-8.
13. Hu, J.; Liu, J.; Ghirlando, R.; Saltiel, A. R., and Hubbard, S. R. *Structural basis for recruitment of the adaptor protein APS to the activated insulin receptor*. *Mol Cell*. 2003 Dec; 12(6):1379-89.
14. Yabana, N. and Shibuya, M. *Adaptor protein APS binds the NH2-terminal autoinhibitory domain of guanine nucleotide exchange factor Vav3 and augments its activity*. *Oncogene*. 2002 Oct 31; 21(50):7720-9.
15. Wollberg, P.; Lennartsson, J.; Gottfridsson, E.; Yoshimura, A., and Ronnstrand, L. *The adapter protein APS associates with the multifunctional docking sites Tyr-568 and Tyr-936 in c-Kit*. *Biochem J*. 2003 Mar 15; 370(Pt 3):1033-8.
16. Yokouchi, M.; Wakioka, T.; Sakamoto, H.; Yasukawa, H.; Ohtsuka, S.; Sasaki, A.; Ohtsubo, M.; Valius, M.; Inoue, A.; Komiyama, S., and Yoshimura, A. *APS, an adaptor protein containing PH and SH2 domains, is associated with the PDGF receptor and c-Cbl and inhibits PDGF-induced mitogenesis*. *Oncogene*. 1999 Jan 21; 18(3):759-67.

17. Ahmed, Z. and Pillay, T. S. *Adapter protein with a pleckstrin homology (PH) and an Src homology 2 (SH2) domain (APS) and SH2-B enhance insulin-receptor autophosphorylation, extracellular-signal-regulated kinase and phosphoinositide 3-kinase-dependent signalling.* Biochem J. 2003 Apr 15; 371(Pt 2):405-12.
18. Elchebly, M.; Payette, P.; Michaliszyn, E.; Cromlish, W.; Collins, S.; Loy, A. L.; Normandin, D.; Cheng, A.; Himms-Hagen, J.; Chan, C. C.; Ramachandran, C.; Gresser, M. J.; Tremblay, M. L., and Kennedy, B. P. *Increased insulin sensitivity and obesity resistance in mice lacking the protein tyrosine phosphatase-1B gene.* Science. 1999 Mar 5; 283(5407):1544-8.
19. Byon, J. C.; Kusari, A. B., and Kusari, J. *Protein-tyrosine phosphatase-1B acts as a negative regulator of insulin signal transduction.* Mol Cell Biochem. 1998 May; 182(1-2):101-8.
20. Bandyopadhyay, D.; Kusari, A.; Kenner, K. A.; Liu, F.; Chernoff, J.; Gustafson, T. A., and Kusari, J. *Protein-tyrosine phosphatase 1B complexes with the insulin receptor in vivo and is tyrosine-phosphorylated in the presence of insulin.* J Biol Chem. 1997 Jan 17; 272(3):1639-45.
21. Saltiel, A. R. and Kahn, C. R. *Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism.* Nature. 2001 Dec 13; 414(6865):799-806.
22. Ribon, V.; Printen, J. A.; Hoffman, N. G.; Kay, B. K., and Saltiel, A. R. *A novel, multifunctional c-Cbl binding protein in insulin receptor signaling in 3T3-L1 adipocytes.* Mol Cell Biol. 1998 Feb; 18(2):872-9.
23. Baumann, C. A.; Ribon, V.; Kanzaki, M.; Thurmond, D. C.; Mora, S.; Shigematsu, S.; Bickel, P. E.; Pessin, J. E., and Saltiel, A. R. *CAP defines a second signalling pathway required for insulin-stimulated glucose transport.* Nature. 2000 Sep 14; 407(6801):202-7.

24. Chiang, S. H.; Baumann, C. A.; Kanzaki, M.; Thurmond, D. C.; Watson, R. T.; Neudauer, C. L.; Macara, I. G.; Pessin, J. E., and Saltiel, A. R. *Insulin-stimulated GLUT4 translocation requires the CAP-dependent activation of TC10*. *Nature*. 2001 Apr 19; 410(6831):944-8.
25. Ahn, M. Y.; Katsanakis, K. D.; Bheda, F., and Pillay, T. S. *Primary and essential role of the adaptor protein APS for recruitment of both c-Cbl and its associated protein CAP in insulin signaling*. *J Biol Chem*. 2004 May 14; 279(20):21526-32.
26. Ahmed, Z.; Smith, B. J., and Pillay, T. S. *The APS adapter protein couples the insulin receptor to the phosphorylation of c-Cbl and facilitates ligand-stimulated ubiquitination of the insulin receptor*. *FEBS Lett*. 2000 Jun 9; 475(1):31-4.
27. Tsygankov, A. Y.; Teckchandani, A. M.; Feshchenko, E. A., and Swaminathan, G. *Beyond the RING: CBL proteins as multivalent adapters*. *Oncogene*. 2001 Oct 1; 20(44):6382-402.
28. Wilcox, A.; Katsanakis, K. D.; Bheda, F., and Pillay, T. S. *Asb6, an adipocyte-specific ankyrin and SOCS box protein, interacts with APS to enable recruitment of Elongins B and C to the insulin receptor signaling complex*. *J Biol Chem*. 2004 Jul 1.
29. O'Brien, K. B.; O'Shea, J. J., and Carter-Su, C. *SH2-B family members differentially regulate JAK family tyrosine kinases*. *J Biol Chem*. 2002 Mar 8; 277(10):8673-81.
30. Qian, X.; Riccio, A.; Zhang, Y., and Ginty, D. D. *Identification and characterization of novel substrates of Trk receptors in developing neurons*. *Neuron*. 1998 Nov; 21(5):1017-29.
31. Iseki, M.; Kubo, C.; Kwon, S. M.; Yamaguchi, A.; Kataoka, Y.; Yoshida, N.; Takatsu, K., and Takaki, S. *Increased numbers of B-1 cells and enhanced responses against TI-2 antigen in mice lacking APS, an adaptor molecule containing PH and SH2 domains*. *Mol Cell Biol*. 2004 Mar; 24(6):2243-50.

32. Kubo-Akashi, C.; Iseki, M.; Kwon, S. M.; Takizawa, H.; Takatsu, K., and Takaki, S. *Roles of a conserved family of adaptor proteins, Lnk, SH2-B, and APS, for mast cell development, growth, and functions: APS-deficiency causes augmented degranulation and reduced actin assembly.* Biochem Biophys Res Commun. 2004 Mar 5; 315(2):356-62.
33. Huang, X.; Li, Y.; Tanaka, K.; Moore, K. G., and Hayashi, J. I. *Cloning and characterization of Lnk, a signal transduction protein that links T-cell receptor activation signal to phospholipase C gamma 1, Grb2, and phosphatidylinositol 3-kinase.* Proc Natl Acad Sci U S A. 1995 Dec 5; 92(25):11618-22.
34. Li, Y.; He, X.; Schembri-King, J.; Jakes, S., and Hayashi, J. *Cloning and characterization of human Lnk, an adaptor protein with pleckstrin homology and Src homology 2 domains that can inhibit T cell activation.* J Immunol. 2000 May 15; 164(10):5199-206.
35. Takaki, S.; Sauer, K.; Iritani, B. M.; Chien, S.; Ebihara, Y.; Tsuji, K.; Takatsu, K., and Perlmutter, R. M. *Control of B cell production by the adaptor protein Lnk. Definition Of a conserved family of signal-modulating proteins.* Immunity. 2000 Nov; 13(5):599-609.
36. Takaki, S.; Morita, H.; Tezuka, Y., and Takatsu, K. *Enhanced hematopoiesis by hematopoietic progenitor cells lacking intracellular adaptor protein, Lnk.* J Exp Med. 2002 Jan 21; 195(2):151-60.
37. Velazquez, L.; Cheng, A. M.; Fleming, H. E.; Furlonger, C.; Vesely, S.; Bernstein, A.; Paige, C. J., and Pawson, T. *Cytokine signaling and hematopoietic homeostasis are disrupted in Lnk-deficient mice.* J Exp Med. 2002 Jun 17; 195(12):1599-611.
38. Takaki, S.; Tezuka, Y.; Sauer, K.; Kubo, C.; Kwon, S. M.; Armstead, E.; Nakao, K.; Katsuki, M.; Perlmutter, R. M., and Takatsu, K. *Impaired lymphopoiesis and altered B cell subpopulations in mice overexpressing Lnk adaptor protein.* J Immunol. 2003 Jan 15; 170(2):703-10.

39. Nobuhisa, I.; Takizawa, M.; Takaki, S.; Inoue, H.; Okita, K.; Ueno, M.; Takatsu, K., and Taga, T. *Regulation of hematopoietic development in the aorta-gonad-mesonephros region mediated by Lnk adaptor protein*. Mol Cell Biol. 2003 Dec; 23(23):8486-94.
40. Osborne, M. A.; Dalton, S., and Kochan, J. P. *The yeast tribrid system--genetic detection of trans-phosphorylated ITAM-SH2-interactions*. Biotechnology (N Y). 1995 Dec; 13(13):1474-8.
41. Wang, J. and Riedel, H. *Insulin-like growth factor-I receptor and insulin receptor association with a Src homology-2 domain-containing putative adapter*. J Biol Chem. 1998 Feb 6; 273(6):3136-9.
42. Riedel, H.; Wang, J.; Hansen, H., and Yousaf, N. *PSM, an insulin-dependent, pro-rich, PH, SH2 domain containing partner of the insulin receptor*. J Biochem (Tokyo). 1997 Dec; 122(6):1105-13.
43. Nelms, K.; O'Neill, T. J.; Li, S.; Hubbard, S. R.; Gustafson, T. A., and Paul, W. E. *Alternative splicing, gene localization, and binding of SH2-B to the insulin receptor kinase domain*. Mamm Genome. 1999 Dec; 10(12):1160-7.
44. Kotani, K.; Wilden, P., and Pillay, T. S. *SH2-B $\alpha$  is an insulin-receptor adapter protein and substrate that interacts with the activation loop of the insulin-receptor kinase*. Biochem J. 1998 Oct 1; 335 ( Pt 1):103-9.
45. Rui, Liangyou and Carter-Su, Christin. *Platelet-derived Growth Factor (PDGF) Stimulates the Association of SH2-B $\beta$  with PDGF Receptor and Phosphorylation of SH2-B $\beta$* . J. Biol. Chem. 1998 Aug 14; 273(33):21239-21245.
46. Ohtsuka, S.; Takaki, S.; Iseki, M.; Miyoshi, K.; Nakagata, N.; Kataoka, Y.; Yoshida, N.; Takatsu, K., and Yoshimura, A. *SH2-B is required for both male and female reproduction*. Mol Cell Biol. 2002 May; 22(9):3066-77.
47. Kong, M.; Wang, C. S., and Donoghue, D. J. *Interaction of fibroblast growth factor receptor 3 and the adapter protein SH2-B. A role in STAT5 activation*. J Biol Chem. 2002 May 3; 277(18):15962-70.

48. Rui, L.; Mathews, L. S.; Hotta, K.; Gustafson, T. A., and Carter-Su, C. *Identification of SH2-Bbeta as a substrate of the tyrosine kinase JAK2 involved in growth hormone signaling.* Mol Cell Biol. 1997 Nov; 17(11):6633-44.
49. Rui, L. and Carter-Su, C. *Identification of SH2-Bbeta as a potent cytoplasmic activator of the tyrosine kinase Janus kinase 2.* Proc Natl Acad Sci U S A. 1999 Jun 22; 96(13):7172-7.
50. O'Brien, K. B.; Argetsinger, L. S.; Diakonova, M., and Carter-Su, C. *YXXL motifs in SH2-Bbeta are phosphorylated by JAK2, JAK1, and platelet-derived growth factor receptor and are required for membrane ruffling.* J Biol Chem. 2003 Apr 4; 278(14):11970-8.
51. Diakonova, M.; Gunter, D. R.; Herrington, J., and Carter-Su, C. *SH2-Bbeta is a Rac-binding protein that regulates cell motility.* J Biol Chem. 2002 Mar 22; 277(12):10669-77.
52. Rui, L.; Herrington, J., and Carter-Su, C. *SH2-B is required for nerve growth factor-induced neuronal differentiation.* J Biol Chem. 1999 Apr 9; 274(15):10590-4.
53. ---. *SH2-B, a membrane-associated adapter, is phosphorylated on multiple serines/threonines in response to nerve growth factor by kinases within the MEK/ERK cascade.* J Biol Chem. 1999 Sep 10; 274(37):26485-92.
54. Wang, X.; Chen, L.; Maures, T. J.; Herrington, J., and Carter-Su, C. *SH2-B is a positive regulator of nerve growth factor-mediated activation of the Akt/Forkhead pathway in PC12 cells.* J Biol Chem. 2004 Jan 2; 279(1):133-41.
55. Qian, X. and Ginty, D. D. *SH2-B and APS are multimeric adapters that augment TrkA signaling.* Mol Cell Biol. 2001 Mar; 21(5):1613-20.
56. Heldin, C. H.; Ostman, A., and Ronnstrand, L. *Signal transduction via platelet-derived growth factor receptors.* Biochim Biophys Acta. 1998 Aug 19; 1378(1):F79-113.

57. Heldin, C. H. and Westermark, B. *Mechanism of action and in vivo role of platelet-derived growth factor*. *Physiol Rev.* 1999 Oct; 79(4):1283-316.
58. Claesson-Welsh, L. *Mechanism of action of platelet-derived growth factor*. *Int J Biochem Cell Biol.* 1996 Apr; 28(4):373-85.
59. Bergsten, E; Uutela, M; Li, X; Pietras, K; Ostman, A; Heldin, C H; Alitalo, K, and Eriksson, U. *PDGF-D is a specific, protease-activated ligand for the PDGF beta-receptor*. *Nature Cell Biology.* 2001 May; 3(5):512-516.
60. Li, X; Ponten, A; Aase, K; Karlsson, L; Abramsson, A; Uutela, M; Backstrom, G; Hellstrom, M; Bostrom, H, and Li et, al. *PDGF-C is a new protease-activated ligand for the PDGF alpha-receptor*. *Nature Cell Biology.* 2000 May; 2(5):302-309.
61. Li, X. and Eriksson, U. *Novel PDGF family members: PDGF-C and PDGF-D*. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2003 Apr; 14(2):91-8.
62. Rosnet, O. and Birnbaum, D. *Hematopoietic receptors of class III receptor-type tyrosine kinases*. *Crit Rev Oncog.* 1993; 4(6):595-613.
63. Alberts, Bruce; Bray, Dennis; Lewis, Julian; Raff, Martin; Roberts, Keith, and Watson, James D. *Molecular Biology of the Cell*. Troisième édition, Garland Publishing Inc, New York & London, Chapitres 12 et 13.
64. Keating, MT; Harryman, CC, and Williams, LT. *Platelet-derived growth factor receptor inducibility is acquired immediately after translation and does not require glycosylation*. *J. Biol. Chem.* 1989 Jun 5; 264(16):9129-9132.
65. Hart, CE; Seifert, RA; Ross, R, and Bowen-Pope, DF. *Synthesis, phosphorylation, and degradation of multiple forms of the platelet-derived growth factor receptor studied using a monoclonal antibody*. *J. Biol. Chem.* 1987 Aug 5; 262(22):10780-10785.
66. Liu, P.; Ying, Y.; Ko, Y. G., and Anderson, R. G. *Localization of platelet-derived growth factor-stimulated phosphorylation cascade to caveolae*. *J Biol Chem.* 1996 Apr 26; 271(17):10299-303.

67. Sorkin, A.; Eriksson, A.; Heldin, C. H.; Westermark, B., and Claesson-Welsh, L. *Pool of ligand-bound platelet-derived growth factor beta-receptors remain activated and tyrosine phosphorylated after internalization.* J Cell Physiol. 1993 Aug; 156(2):373-82.
68. Sorkin, A.; Westermark, B.; Heldin, C. H., and Claesson-Welsh, L. *Effect of receptor kinase inactivation on the rate of internalization and degradation of PDGF and the PDGF beta-receptor.* J Cell Biol. 1991 Feb; 112(3):469-78.
69. Mori, S.; Heldin, C. H., and Claesson-Welsh, L. *Ligand-induced polyubiquitination of the platelet-derived growth factor beta-receptor.* J Biol Chem. 1992 Mar 25; 267(9):6429-34.
70. Mori, S.; Tanaka, K.; Omura, S., and Saito, Y. *Degradation process of ligand-stimulated platelet-derived growth factor beta-receptor involves ubiquitin-proteasome proteolytic pathway.* J Biol Chem. 1995 Dec 8; 270(49):29447-52.
71. Keating, MT and Williams, LT. *Processing of the platelet-derived growth factor receptor. Biosynthetic and degradation studies using anti-receptor antibodies.* J. Biol. Chem. 1987 Jun 5; 262(16):7932-7937.
72. Inui, H; Kitami, Y; Tani, M; Kondo, T, and Inagami, T. *Differences in signal transduction between platelet-derived growth factor (PDGF) alpha and beta receptors in vascular smooth muscle cells. PDGF-BB is a potent mitogen, but PDGF-AA promotes only protein synthesis without activation of DNA synthesis.* J. Biol. Chem. 1994 Dec 2; 269(48):30546-30552.
73. Yu, J.; Deuel, T. F., and Kim, H. R. *Platelet-derived growth factor (PDGF) receptor-alpha activates c-Jun NH2-terminal kinase-1 and antagonizes PDGF receptor-beta -induced phenotypic transformation.* J Biol Chem. 2000 Jun 23; 275(25):19076-82.
74. Bishayee, S; Majumdar, S; Khire, J, and Das, M. *Ligand-induced dimerization of the platelet-derived growth factor receptor. Monomer-dimer interconversion occurs independent of receptor phosphorylation.* J. Biol. Chem. 1989 Jul 15; 264(20):11699-11705.

75. Li, W. and Schlessinger, J. *Platelet-derived growth factor (PDGF)-induced disulfide-linked dimerization of PDGF receptor in living cells*. Mol Cell Biol. 1991 Jul; 11(7):3756-61.
76. Heldin, C. H. and Ostman, A. *Ligand-induced dimerization of growth factor receptors: variations on the theme*. Cytokine Growth Factor Rev. 1996 Jun; 7(1):3-10.
77. Yu, J.; Ustach, C., and Kim, H. R. *Platelet-derived growth factor signaling and human cancer*. J Biochem Mol Biol. 2003 Jan 31; 36(1):49-59.
78. Beckmann, M. P.; Betsholtz, C.; Heldin, C. H.; Westermark, B.; Di Marco, E.; Di Fiore, P. P.; Robbins, K. C., and Aaronson, S. A. *Comparison of biological properties and transforming potential of human PDGF-A and PDGF-B chains*. Science. 1988 Sep 9; 241(4871):1346-9.
79. Wymann, M. P. and Pirola, L. *Structure and function of phosphoinositide 3-kinases*. Biochim Biophys Acta. 1998 Dec 8; 1436(1-2):127-50.
80. Rordorf-Nikolic, T.; Van Horn, D. J.; Chen, D.; White, M. F., and Backer, J. M. *Regulation of phosphatidylinositol 3'-kinase by tyrosyl phosphoproteins. Full activation requires occupancy of both SH2 domains in the 85-kDa regulatory subunit*. J Biol Chem. 1995 Feb 24; 270(8):3662-6.
81. Cantley, L. C. *The phosphoinositide 3-kinase pathway*. Science. 2002 May 31; 296(5573):1655-7.
82. Scheid, M. P. and Woodgett, J. R. *Unravelling the activation mechanisms of protein kinase B/Akt*. FEBS Lett. 2003 Jul 3; 546(1):108-12.
83. Datta, S. R.; Dudek, H.; Tao, X.; Masters, S.; Fu, H.; Gotoh, Y., and Greenberg, M. E. *Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery*. Cell. 1997 Oct 17; 91(2):231-41.
84. Brazil, D. P. and Hemmings, B. A. *Ten years of protein kinase B signalling: a hard Akt to follow*. Trends Biochem Sci. 2001 Nov; 26(11):657-64.

85. Carpenter, C. L.; Duckworth, B. C.; Auger, K. R.; Cohen, B.; Schaffhausen, B. S., and Cantley, L. C. *Purification and characterization of phosphoinositide 3-kinase from rat liver*. J Biol Chem. 1990 Nov 15; 265(32):19704-11.
86. Escobedo, J. A.; Navankasattusas, S.; Kavanaugh, W. M.; Milfay, D.; Fried, V. A., and Williams, L. T. *cDNA cloning of a novel 85 kd protein that has SH2 domains and regulates binding of PI3-kinase to the PDGF beta-receptor*. Cell. 1991 Apr 5; 65(1):75-82.
87. McGlade, C. J.; Ellis, C.; Reedijk, M.; Anderson, D.; Mbamalu, G.; Reith, A. D.; Panayotou, G.; End, P.; Bernstein, A.; Kazlauskas, A., and et, a. I. *SH2 domains of the p85 alpha subunit of phosphatidylinositol 3-kinase regulate binding to growth factor receptors*. Mol Cell Biol. 1992 Mar; 12(3):991-7.
88. Panayotou, G.; Gish, G.; End, P.; Truong, O.; Gout, I.; Dhand, R.; Fry, M. J.; Hiles, I.; Pawson, T., and Waterfield, M. D. *Interactions between SH2 domains and tyrosine-phosphorylated platelet-derived growth factor beta-receptor sequences: analysis of kinetic parameters by a novel biosensor-based approach*. Mol Cell Biol. 1993 Jun; 13(6):3567-76.
89. Kavanaugh, W. M.; Turck, C. W.; Klippel, A., and Williams, L. T. *Tyrosine 508 of the 85-kilodalton subunit of phosphatidylinositol 3-kinase is phosphorylated by the platelet-derived growth factor receptor*. Biochemistry. 1994 Sep 13; 33(36):11046-50.
90. Kavanaugh, W. M.; Klippel, A.; Escobedo, J. A., and Williams, L. T. *Modification of the 85-kilodalton subunit of phosphatidylinositol-3 kinase in platelet-derived growth factor-stimulated cells*. Mol Cell Biol. 1992 Aug; 12(8):3415-24.
91. Wennstrom, S.; Siegbahn, A.; Yokote, K.; Arvidsson, A. K.; Heldin, C. H.; Mori, S., and Claesson-Welsh, L. *Membrane ruffling and chemotaxis transduced by the PDGF beta-receptor require the binding site for phosphatidylinositol 3' kinase*. Oncogene. 1994 Feb; 9(2):651-60.

92. Wennstrom, S.; Hawkins, P.; Cooke, F.; Hara, K.; Yonezawa, K.; Kasuga, M.; Jackson, T.; Claesson-Welsh, L., and Stephens, L. *Activation of phosphoinositide 3-kinase is required for PDGF-stimulated membrane ruffling.* *Curr Biol.* 1994 May 1; 4(5):385-93.
93. Kundra, V.; Escobedo, J. A.; Kazlauskas, A.; Kim, H. K.; Rhee, S. G.; Williams, L. T., and Zetter, B. R. *Regulation of chemotaxis by the platelet-derived growth factor receptor-beta.* *Nature.* 1994 Feb 3; 367(6462):474-6.
94. Hooshmand-Rad, R.; Claesson-Welsh, L.; Wennstrom, S.; Yokote, K.; Siegbahn, A., and Heldin, C. H. *Involvement of phosphatidylinositide 3'-kinase and Rac in platelet-derived growth factor-induced actin reorganization and chemotaxis.* *Exp Cell Res.* 1997 Aug 1; 234(2):434-41.
95. Yao, R. and Cooper, G. M. *Requirement for phosphatidylinositol-3 kinase in the prevention of apoptosis by nerve growth factor.* *Science.* 1995 Mar 31; 267(5206):2003-6.
96. DeMali, Kris A.; Whiteford, Craig C.; Ulug, Emin T., and Kazlauskas, Andrius. *Platelet-derived Growth Factor-dependent Cellular Transformation Requires Either Phospholipase Cgamma or Phosphatidylinositol 3Kinase.* *J. Biol. Chem.* 1997 Apr 4; 272(14):9011-9018.
97. Rodriguez-Viciana, P.; Warne, P. H.; Khwaja, A.; Marte, B. M.; Pappin, D.; Das, P.; Waterfield, M. D.; Ridley, A., and Downward, J. *Role of phosphoinositide 3-OH kinase in cell transformation and control of the actin cytoskeleton by Ras.* *Cell.* 1997 May 2; 89(3):457-67.
98. Rosenmuller, T.; Rydh, K., and Nanberg, E. *Role of phosphoinositide 3OH-kinase in autocrine transformation by PDGF-BB.* *J Cell Physiol.* 2001 Sep; 188(3):369-82.
99. Feng, G. S. *Shp-2 tyrosine phosphatase: signaling one cell or many.* *Exp Cell Res.* 1999 Nov 25; 253(1):47-54.

100. Lechleider, R. J.; Sugimoto, S.; Bennett, A. M.; Kashishian, A. S.; Cooper, J. A.; Shoelson, S. E.; Walsh, C. T., and Neel, B. G. *Activation of the SH2-containing phosphotyrosine phosphatase SH-PTP2 by its binding site, phosphotyrosine 1009, on the human platelet-derived growth factor receptor.* J Biol Chem. 1993 Oct 15; 268(29):21478-81.
101. Pluskey, S.; Wandless, T. J.; Walsh, C. T., and Shoelson, S. E. *Potent stimulation of SH-PTP2 phosphatase activity by simultaneous occupancy of both SH2 domains.* J Biol Chem. 1995 Feb 17; 270(7):2897-900.
102. Eck, M. J.; Pluskey, S.; Trub, T.; Harrison, S. C., and Shoelson, S. E. *Spatial constraints on the recognition of phosphoproteins by the tandem SH2 domains of the phosphatase SH-PTP2.* Nature. 1996 Jan 18; 379(6562):277-80.
103. Zhao, Z.; Larocque, R.; Ho, W. T.; Fischer, E. H., and Shen, S. H. *Purification and characterization of PTP2C, a widely distributed protein tyrosine phosphatase containing two SH2 domains.* J Biol Chem. 1994 Mar 25; 269(12):8780-5.
104. Dechert, U.; Adam, M.; Harder, K. W.; Clark-Lewis, I., and Jirik, F. *Characterization of protein tyrosine phosphatase SH-PTP2. Study of phosphopeptide substrates and possible regulatory role of SH2 domains.* J Biol Chem. 1994 Feb 25; 269(8):5602-11.
105. Hof, P.; Pluskey, S.; Dhe-Paganon, S.; Eck, M. J., and Shoelson, S. E. *Crystal structure of the tyrosine phosphatase SHP-2.* Cell. 1998 Feb 20; 92(4):441-50.
106. Vogel, W.; Lammers, R.; Huang, J., and Ullrich, A. *Activation of a phosphotyrosine phosphatase by tyrosine phosphorylation.* Science. 1993 Mar 12; 259(5101):1611-4.
107. Feng, G. S.; Hui, C. C., and Pawson, T. *SH2-containing phosphotyrosine phosphatase as a target of protein-tyrosine kinases.* Science. 1993 Mar 12; 259(5101):1607-11.

108. Bennett, A. M.; Tang, T. L.; Sugimoto, S.; Walsh, C. T., and Neel, B. G. *Protein-tyrosine-phosphatase SHPTP2 couples platelet-derived growth factor receptor beta to Ras*. Proc Natl Acad Sci U S A. 1994 Jul 19; 91(15):7335-9.
109. Lu, W.; Gong, D.; Bar-Sagi, D., and Cole, P. A. *Site-specific incorporation of a phosphotyrosine mimetic reveals a role for tyrosine phosphorylation of SHP-2 in cell signaling*. Mol Cell. 2001 Oct; 8(4):759-69.
110. Sugimoto, S.; Wandless, T. J.; Shoelson, S. E.; Neel, B. G., and Walsh, C. T. *Activation of the SH2-containing protein tyrosine phosphatase, SH-PTP2, by phosphotyrosine-containing peptides derived from insulin receptor substrate-1*. J Biol Chem. 1994 May 6; 269(18):13614-22.
111. Barford, D. and Neel, B. G. *Revealing mechanisms for SH2 domain mediated regulation of the protein tyrosine phosphatase SHP-2*. Structure. 1998 Mar 15; 6(3):249-54.
112. Araki, T.; Nawa, H., and Neel, B. G. *Tyrosyl phosphorylation of Shp2 is required for normal ERK activation in response to some, but not all, growth factors*. J Biol Chem. 2003 Oct 24; 278(43):41677-84.
113. Ronnstrand, L.; Arvidsson, A. K.; Kallin, A.; Rorsman, C.; Hellman, U.; Engstrom, U.; Wernstedt, C., and Heldin, C. H. *SHP-2 binds to Tyr763 and Tyr1009 in the PDGF beta-receptor and mediates PDGF-induced activation of the Ras/MAP kinase pathway and chemotaxis*. Oncogene. 1999 Jun 24; 18(25):3696-702.
114. Qi, J. H.; Ito, N., and Claesson-Welsh, L. *Tyrosine phosphatase SHP-2 is involved in regulation of platelet-derived growth factor-induced migration*. J Biol Chem. 1999 May 14; 274(20):14455-63.
115. Klinghoffer, R. A. and Kazlauskas, A. *Identification of a putative Syp substrate, the PDGF beta receptor*. J Biol Chem. 1995 Sep 22; 270(38):22208-17.

116. Zhao, R. and Zhao, Z. J. *Tyrosine phosphatase SHP-2 dephosphorylates the platelet-derived growth factor receptor but enhances its downstream signalling.* Biochem J. 1999 Feb 15; 338 ( Pt 1):35-9.
117. Vogel, W. and Ullrich, A. *Multiple in vivo phosphorylated tyrosine phosphatase SHP-2 engages binding to Grb2 via tyrosine 584.* Cell Growth Differ. 1996 Dec; 7(12):1589-97.
118. Ivins Zito, C.; Kontaridis, M. I.; Fornaro, M.; Feng, G. S., and Bennett, A. M. *SHP-2 regulates the phosphatidylinositide 3'-kinase/Akt pathway and suppresses caspase 3-mediated apoptosis.* J Cell Physiol. 2004 May; 199(2):227-36.
119. Wu, C. J.; O'Rourke, D. M.; Feng, G. S.; Johnson, G. R.; Wang, Q., and Greene, M. I. *The tyrosine phosphatase SHP-2 is required for mediating phosphatidylinositol 3-kinase/Akt activation by growth factors.* Oncogene. 2001 Sep 20; 20(42):6018-25.
120. Hakak, Y.; Hsu, Y. S., and Martin, G. S. *Shp-2 mediates v-Src-induced morphological changes and activation of the anti-apoptotic protein kinase Akt.* Oncogene. 2000 Jun 29; 19(28):3164-71.
121. Klinghoffer, R. A.; Duckworth, B.; Valius, M.; Cantley, L., and Kazlauskas, A. *Platelet-derived growth factor-dependent activation of phosphatidylinositol 3-kinase is regulated by receptor binding of SH2-domain-containing proteins which influence Ras activity.* Mol Cell Biol. 1996 Oct; 16(10):5905-14.
122. Gesbert, F.; Guenzi, C., and Bertoglio, J. *A new tyrosine-phosphorylated 97-kDa adaptor protein mediates interleukin-2-induced association of SHP-2 with p85-phosphatidylinositol 3-kinase in human T lymphocytes.* J Biol Chem. 1998 Jul 17; 273(29):18273-81.
123. Welham, M. J.; Dechert, U.; Leslie, K. B.; Jirik, F., and Schrader, J. W. *Interleukin (IL)-3 and granulocyte/macrophage colony-stimulating factor, but not IL-4, induce tyrosine phosphorylation, activation, and association of SHPTP2 with Grb2 and phosphatidylinositol 3'-kinase.* J Biol Chem. 1994 Sep 23; 269(38):23764-8.

124. Schlaepfer, D. D.; Broome, M. A., and Hunter, T. *Fibronectin-stimulated signaling from a focal adhesion kinase-c-Src complex: involvement of the Grb2, p130cas, and Nck adaptor proteins*. Mol Cell Biol. 1997 Mar; 17(3):1702-13.
125. Bradshaw, J. Michael; Mitaxov, Vesselin, and Waksman, Gabriel. *Investigation of phosphotyrosine recognition by the SH2 domain of the Src kinase*. Journal of Molecular Biology. 1999 Nov 5; 293(4):971-985.
126. Bibbins, K. B.; Boeuf, H., and Varmus, H. E. *Binding of the Src SH2 domain to phosphopeptides is determined by residues in both the SH2 domain and the phosphopeptides*. Mol Cell Biol. 1993 Dec; 13(12):7278-87.
127. DeMali, K. A.; Godwin, S. L.; Soltoff, S. P., and Kazlauskas, A. *Multiple roles for Src in a PDGF-stimulated cell*. Exp Cell Res. 1999 Nov 25; 253(1):271-9.
128. Chen, R.; Kim, O.; Yang, J.; Sato, K.; Eisenmann, K. M.; McCarthy, J.; Chen, H., and Qiu, Y. *Regulation of Akt/PKB activation by tyrosine phosphorylation*. J Biol Chem. 2001 Aug 24; 276(34):31858-62.
129. Huyer, Gregory; Liu, Susana; Kelly, John; Moffat, Jason; Payette, Paul; Kennedy, Brian; Tsapralis, George; Gresser, Michael J., and Ramachandran, Chidambaram. *Mechanism of Inhibition of Protein-tyrosine Phosphatases by Vanadate and Pervanadate*. J. Biol. Chem. 1997 Jan 10; 272(2):843-851.
130. Cuevas, B. D.; Lu, Y.; Mao, M.; Zhang, J.; LaPushin, R.; Siminovitch, K., and Mills, G. B. *Tyrosine phosphorylation of p85 relieves its inhibitory activity on phosphatidylinositol 3-kinase*. J Biol Chem. 2001 Jul 20; 276(29):27455-61.
131. Martinez-Lorenzo, M. J.; Anel, A.; Monleon, I.; Sierra, J. J.; Pineiro, A.; Naval, J., and Alava, M. A. *Tyrosine phosphorylation of the p85 subunit of phosphatidylinositol 3-kinase correlates with high proliferation rates in sublines derived from the Jurkat leukemia*. Int J Biochem Cell Biol. 2000 Apr; 32(4):435-45.

132. Kuwahara, K.; Kawai, T.; Mitsuyoshi, S.; Matsuo, Y.; Kikuchi, H.; Imajoh-Ohmi, S.; Hashimoto, E.; Inui, S.; Cooper, M. D., and Sakaguchi, N. *Cross-linking of B cell antigen receptor-related structure of pre-B cell lines induces tyrosine phosphorylation of p85 and p110 subunits and activation of phosphatidylinositol 3-kinase*. *Int Immunol*. 1996 Aug; 8(8):1273-85.
133. von Willebrand, M.; Williams, S.; Saxena, M.; Gilman, J.; Tailor, P.; Jascur, T.; Amarante-Mendes, G. P.; Green, D. R., and Mustelin, T. *Modification of phosphatidylinositol 3-kinase SH2 domain binding properties by Abl- or Lck-mediated tyrosine phosphorylation at Tyr-688*. *J Biol Chem*. 1998 Feb 13; 273(7):3994-4000.
134. Klippel, A.; Escobedo, J. A.; Fantl, W. J., and Williams, L. T. *The C-terminal SH2 domain of p85 accounts for the high affinity and specificity of the binding of phosphatidylinositol 3-kinase to phosphorylated platelet-derived growth factor beta receptor*. *Mol Cell Biol*. 1992 Apr; 12(4):1451-9.
135. Liu, Y. and Rohrschneider, L. R. *The gift of Gab*. *FEBS Lett*. 2002 Mar 27; 515(1-3):1-7.
136. Vignais, M. L.; Sadowski, H. B.; Watling, D.; Rogers, N. C., and Gilman, M. *Platelet-derived growth factor induces phosphorylation of multiple JAK family kinases and STAT proteins*. *Mol Cell Biol*. 1996 Apr; 16(4):1759-69.
137. Vignais, ML; Sadowski, HB; Watling, D; Rogers, NC, and Gilman, M. *Platelet-derived growth factor induces phosphorylation of multiple JAK family kinases and STAT proteins*. *Mol. Cell. Biol*. 1996 Apr 1; 16(4):1759-1769.
138. Mahboobi, S.; Teller, S.; Pongratz, H.; Hufsky, H.; Sellmer, A.; Botzki, A.; Uecker, A.; Beckers, T.; Baasner, S.; Schachtele, C.; Uberall, F.; Kassack, M. U.; Dove, S., and Bohmer, F. D. *Bis(1H-2-indolyl)methanones as a novel class of inhibitors of the platelet-derived growth factor receptor kinase*. *J Med Chem*. 2002 Feb 28; 45(5):1002-18.

139. Alessi, D. R.; Caudwell, F. B.; Andjelkovic, M.; Hemmings, B. A., and Cohen, P. *Molecular basis for the substrate specificity of protein kinase B; comparison with MAPKAP kinase-1 and p70 S6 kinase*. FEBS Lett. 1996 Dec 16; 399(3):333-8.
140. Datta, K; Franke, TF; Chan, TO; Makris, A; Yang, SI; Kaplan, DR; Morrison, DK; Golemis, EA, and Tsichlis, PN. *AH/PH domain-mediated interaction between Akt molecules and its potential role in Akt regulation*. Mol. Cell. Biol. 1995 Apr 1; 15(4):2304-2310.
141. Klippel, A.; Reinhard, C.; Kavanaugh, W. M.; Apell, G.; Escobedo, M. A., and Williams, L. T. *Membrane localization of phosphatidylinositol 3-kinase is sufficient to activate multiple signal-transducing kinase pathways*. Mol Cell Biol. 1996 Aug; 16(8):4117-27.
142. Holt, K. H.; Olson, L.; Moyer-Rowley, W. S., and Pessin, J. E. *Phosphatidylinositol 3-kinase activation is mediated by high-affinity interactions between distinct domains within the p110 and p85 subunits*. Mol Cell Biol. 1994 Jan; 14(1):42-9.
143. Serve, H.; Hsu, Y. C., and Besmer, P. *Tyrosine residue 719 of the c-kit receptor is essential for binding of the P85 subunit of phosphatidylinositol (PI) 3-kinase and for c-kit-associated PI 3-kinase activity in COS-1 cells*. J Biol Chem. 1994 Feb 25; 269(8):6026-30.
144. Serve, H.; Yee, N. S.; Stella, G.; Sepp-Lorenzino, L.; Tan, J. C., and Besmer, P. *Differential roles of PI3-kinase and Kit tyrosine 821 in Kit receptor-mediated proliferation, survival and cell adhesion in mast cells*. EMBO J. 1995 Feb 1; 14(3):473-83.
145. Coffey, P. J.; Jin, J., and Woodgett, J. R. *Protein kinase B (c-Akt): a multifunctional mediator of phosphatidylinositol 3-kinase activation*. Biochem J. 1998 Oct 1; 335 ( Pt 1):1-13.
146. Srivastava, A. K. and Pandey, S. K. *Potential mechanism(s) involved in the regulation of glycogen synthesis by insulin*. Mol Cell Biochem. 1998 May; 182(1-2):135-41.

147. Cross, D. A.; Alessi, D. R.; Cohen, P.; Andjelkovich, M., and Hemmings, B. A. *Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B*. *Nature*. 1995 Dec 21-1995 Dec 28; 378(6559):785-9.
148. Staal, S. P. and Hartley, J. W. *Thymic lymphoma induction by the AKT8 murine retrovirus*. *J Exp Med*. 1988 Mar 1; 167(3):1259-64.
149. Staal, S. P. *Molecular cloning of the akt oncogene and its human homologues AKT1 and AKT2: amplification of AKT1 in a primary human gastric adenocarcinoma*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1987 Jul; 84(14):5034-7.
150. Cheng, J. Q.; Godwin, A. K.; Bellacosa, A.; Taguchi, T.; Franke, T. F.; Hamilton, T. C.; Tschlis, P. N., and Testa, J. R. *AKT2, a putative oncogene encoding a member of a subfamily of protein-serine/threonine kinases, is amplified in human ovarian carcinomas*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992 Oct 1; 89(19):9267-71.
151. Vasko, V.; Saji, M.; Hardy, E.; Kruhlak, M.; Larin, A.; Savchenko, V.; Miyakawa, M.; Isozaki, O.; Murakami, H.; Tsushima, T.; Burman, K. D.; De Micco, C., and Ringel, M. D. *Akt activation and localisation correlate with tumour invasion and oncogene expression in thyroid cancer*. *J Med Genet*. 2004 Mar; 41(3):161-70.
152. Fresno Vara, J. A.; Casado, E.; de Castro, J.; Cejas, P.; Belda-Iniesta, C., and Gonzalez-Baron, M. *PI3K/Akt signalling pathway and cancer*. *Cancer Treat Rev*. 2004 Apr; 30(2):193-204.
153. Wendel, H. G.; De Stanchina, E.; Fridman, J. S.; Malina, A.; Ray, S.; Kogan, S.; Cordon-Cardo, C.; Pelletier, J., and Lowe, S. W. *Survival signalling by Akt and eIF4E in oncogenesis and cancer therapy*. *Nature*. 2004 Mar 18; 428(6980):332-7.
154. Mitsiades, C. S.; Mitsiades, N., and Koutsilieris, M. *The Akt pathway: molecular targets for anti-cancer drug development*. *Curr Cancer Drug Targets*. 2004 May; 4(3):235-56.