



# **Rôle de la phosphorylation sur tyrosine dans la régulation de l'activité de PPAR $\gamma$**

**Mémoire**

**Marie-Hélène Lavallée-Bourget**

**Maîtrise en physiologie-endocrinologie**  
Maître ès sciences (M. Sc.)

Québec, Canada

© Marie-Hélène Lavallée-Bourget, 2016

# **Rôle de la phosphorylation sur tyrosine dans la régulation de l'activité de PPAR $\gamma$**

**Mémoire**

**Marie-Hélène Lavallée-Bourget**

Sous la direction de :

André Marette, directeur de recherche

## Résumé

L'obésité et ses complications telles le diabète et la stéatose hépatique non alcoolique sont des enjeux de santé qui prennent de plus en plus d'ampleur partout sur la planète et la compréhension approfondie des mécanismes physiopathologiques impliqués est essentielle pour mieux contrer ces maladies. La protéine *peroxisome proliferator activated receptor gamma* (PPAR $\gamma$ ) est reconnue pour ses propriétés anti-inflammatoires, insulino-sensibilisantes et pro-adipogéniques. Des résultats antérieurs ont démontré qu'en l'absence de la protéine tyrosine phosphatase *Src homology region 2 domain-containing phosphatase-1* (Shp1), l'activité de PPAR $\gamma$  est augmentée. L'activation de PPAR $\gamma$  par ses agonistes, les thiazolidinediones (TZD), est favorable au contrôle du diabète, mais entraîne certains effets indésirables. Nos recherches ont porté sur l'investigation d'une nouvelle voie de régulation de PPAR $\gamma$ . Nous avons montré que Shp1 et PPAR $\gamma$  interagissent et que PPAR $\gamma$  est phosphorylé sur ses résidus tyrosine. Les résultats suggèrent que la déphosphorylation de PPAR $\gamma$  par Shp1 diminue son activité. Des analyses de modélisation moléculaire suggèrent que cette interaction entre Shp1 et PPAR $\gamma$  dépend de la présence de phosphorylation sur un acide aminé particulier, la tyrosine 355. Ce même résidu est aussi important dans la liaison avec la rosiglitazone, médicament de la classe des TZD. Des expériences de mutagenèse ont montré que l'absence de phosphorylation sur la tyrosine 355 diminue grandement l'activité de la protéine et, qu'à l'inverse, la présence de phosphorylation tend à augmenter son activité. Bien que plusieurs modifications post-traductionnelles aient été décrites dans la littérature, la phosphorylation sur tyrosine de PPAR $\gamma$  demeure très peu étudiée. Nos résultats suggèrent une nouvelle voie de régulation de PPAR $\gamma$  qui pourrait mener à l'élaboration de nouveaux ligands qui exploitent ce mécanisme afin de favoriser les propriétés bénéfiques de ce facteur transcriptionnel pour mieux traiter le diabète de type 2 et diminuer les risques d'effets secondaires.

## Abstract

Obesity and its complications such as type 2 diabetes and non-alcoholic fatty liver disease are becoming worldwide health concerns and more insights into the underlying physiopathological mechanisms are necessary to improve the treatment of these conditions. Peroxisome proliferator activated receptor gamma (PPAR $\gamma$ ) protein is well known for its anti-inflammatory, insulin sensitizing and pro-adipogenic roles. Previous results showed that in absence of the protein tyrosine phosphatase Src homology region 2 domain-containing phosphatase-1 (Shp1), PPAR $\gamma$  activity is increased. PPAR $\gamma$  activation by thiazolidinediones (TZD) is used in the control of diabetes but is also linked to unwanted side effects. We investigated a new mechanism of regulation of PPAR $\gamma$  activity. We show that Shp1 and PPAR $\gamma$  interact and that PPAR $\gamma$  is tyrosine phosphorylated. Our results suggest that Shp1-mediated dephosphorylation of PPAR $\gamma$  reduces its activity. Molecular modeling analyses further suggest that the interaction between Shp1 and PPAR $\gamma$  depends upon the phosphorylation of one specific residue, tyrosine 355. This residue is also important for the binding with rosiglitazone, a member of the TZD drug class. Mutagenesis experiments showed that the absence of phosphorylation on tyrosine residue 355 decreases PPAR $\gamma$  activity, while its phosphorylation tends to increase it. Despite the fact that many post-translational modifications have been reported in the literature, tyrosine phosphorylation of PPAR $\gamma$  remains mostly unexplored. These results suggest a new PPAR $\gamma$  regulating mechanism that could be exploited to elaborate new PPAR $\gamma$  ligands to improve the treatment of type 2 diabetes and to limit side effects.

# Table des matières

Résumé .....	iii
Abstract.....	iv
Table des matières .....	v
Liste des tableaux .....	vii
Chapitre 1 .....	vii
Chapitre 2 .....	vii
Liste des figures.....	viii
Chapitre 1 .....	viii
Chapitre 2 .....	viii
Chapitre 3 .....	viii
Liste des abréviations .....	ix
Remerciements.....	xiii
Avant-propos .....	xiv
Chapitre 1 : Introduction.....	1
L'obésité .....	4
La résistance à l'insuline .....	5
Diabète .....	8
NAFLD.....	9
Traitements pharmacologiques du diabète et de la NAFLD .....	10
PPAR $\gamma$ .....	12
Régulation de l'activité de PPAR $\gamma$ .....	15
Shp1 .....	17
Hypothèse et objectifs .....	20
Chapitre 2: Shp-modulated tyrosine-phosphorylation regulates PPAR $\gamma$ activity in hepatocytes.....	22
Résumé .....	23
Abstract.....	24
Introduction .....	25
Results.....	26
PPAR $\gamma$ interacts with Shp1 .....	26
PPAR $\gamma$ is Shp1-dependently tyrosine phosphorylated.....	27
Identification of novel phospho-tyrosine sites in PPAR $\gamma$ .....	27
Mutation of tyrosine residues modulates PPAR $\gamma$ activity .....	27

Tyrosine 355 mutants do not affect PPAR $\gamma$ localization.....	29
Discussion .....	29
Experimental procedures .....	33
DNA constructs.....	33
Cell culture and transfection .....	33
Immunoprecipitation and western blot.....	34
Mass spectrometry .....	34
Luciferase assay.....	35
Immunofluorescence .....	35
Modeling and docking.....	35
Statistics .....	35
Figures.....	37
Fig. 2.1. ....	37
Fig. 2.2. ....	38
Fig. 2.3. ....	39
Fig. 2.4. ....	40
Fig. 2.5. ....	41
Fig. 2.6. ....	42
Supplemental figures .....	43
Supp. 2.1. ....	43
Supp. 2.2. ....	44
Supp. 2.3. ....	45
Supp. 2.4. ....	46
Bibliography .....	47
Chapitre 3 : Conclusion et perspectives .....	50
Bibliographie .....	55

# Liste des tableaux

## Chapitre 1

Tableau 1.1 Classes de médicaments utilisés dans le traitement du diabète selon le risque d'hypoglycémie qu'elles engendrent, leur effet sur le gain ou la perte de poids et leurs effets indésirables.....12

## Chapitre 2

Tableau 2.1 PPAR $\gamma$ 2 mutagenesis primers.....33

# Liste des figures

## Chapitre 1

Figure 1.1 Cascade moléculaire déclenchée par la liaison de l'insuline à son récepteur	2
Figure 1.2 Prévalence (%) du surpoids chez les adultes	4
Figure 1.3 Mécanismes impliqués dans la mise en place de la résistance à l'insuline	6
Figure 1.4 Mise en place du diabète	8
Figure 1.5 Progression de la stéatose hépatique vers la cirrhose hépatique	10
Figure 1.6 Structure linéaire de PPAR $\gamma$ portant les modifications post-traductionnelles	13
Figure 1.7 Structure tertiaire de la protéine PPAR $\gamma$	14
Figure 1.8 Conformation de la protéine Shp1 représentant les deux domaines SH2 ainsi que le domaine catalytique	18
Figure 1.9 Schéma démontrant l'hypothèse selon laquelle l'inflammation et la résistance à l'insuline peuvent ne pas aller de pair avec la stéatose hépatique	20

## Chapitre 2

Figure 2.1 PPAR $\gamma$ interacts with Shp1	37
Figure 2.2 Tyrosine 355 of PPAR $\gamma$ is important for the interaction with Shp1	38
Figure 2.3 PPAR $\gamma$ is Shp1-dependently tyrosine-phosphorylated	39
Figure 2.4 Identification of novel phospho-tyrosine sites	40
Figure 2.5 Y348 and Y355 mutations affect PPAR $\gamma$ activity	41
Figure 2.6 Y355 mutations do not change PPAR $\gamma$ localization	42
Figure S2.1 PPAR $\gamma$ interacts with Shp1	43
Figure S2.2 PPAR $\gamma$ can be tyrosine phosphorylated	44
Figure S2.3 Identification of phosphorylated tyrosine residues of PPAR $\gamma$ by mass spectrometry	45
Figure S2.4 Y348 and Y355 mutations tend to affect PPAR $\gamma$ activity	46

## Chapitre 3

Figure 3.1 Effet de la rosiglitazone sur l'interaction entre PPAR $\gamma$ et Shp1	51
--	----

## Liste des abréviations

AF-1	Fonction activatrice ligand indépendante
AF-2	Fonction activatrice ligand dépendante
AGPAT	Acylglycérolphosphate acyltransférase
AKT/PKB	Protéine kinase B
ALT	Alanine aminotransférase
aP2	<i>Adipocytes protein 2</i>
AST	Aspartate aminotransférase
AVC	Accident vasculaire cérébral
CEACAM1	<i>carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule-1</i>
CD36	<i>Cluster of differentiation 36</i>
CDK5	Kinase dépendante des cyclines 5
CDK7	Kinase dépendante des cyclines 7
CDK9	Kinase dépendante des cyclines 9
DBD	Domaine de liaison à l'ADN ( <i>DNA binding domain</i> )
DGAT	Diacylglycérol acyltransférase
DPP-4	Dipeptidyl peptidase-4
eEF2	<i>Eukaryotic elongation factor</i>
EGFR	Facteur de croissance épidermique
Erk	<i>Extracellular signal-regulated kinase</i>

FABP4	<i>Fatty acid binding protein 4</i>
FAS	<i>Fatty acid synthase</i>
FATP-1	<i>Fatty acid transport protein 1</i>
FGF21	Facteur de croissance fibroblastique 21
GLP-1	<i>Glucagon-like peptide 1</i>
Glut4	Transporteur de glucose 4
GPAT	Glycérol phosphate acyltransférase
GS	Glycogène synthase
GSK3	Glycogène synthase kinase 3
HDL	Lipoprotéine à haute densité ( <i>high density lipoprotein</i> )
HFD	Diète riche en gras ( <i>high fat diet</i> )
IMC	Indice de masse corporelle
INF $\gamma$	Interféron gamma
IR	Récepteur de l'insuline
IRS	Substrat du récepteur de l'insuline
ITIM	<i>Immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif</i>
KO	<i>Knock out</i>
LBD	Domaine de liaison au ligand ( <i>ligand binding domain</i> )
LDL	Lipoprotéine de faible densité ( <i>low density lipoprotein</i> )
LPL	Lipoprotéine lipase
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>

MEK	<i>Mitogen-activated protein kinase kinase</i>
NAFLD	Stéatose hépatique non alcoolique
NO	Oxyde nitrique
OMS	Organisation mondiale de la santé
PI3K	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase
PMA	Phorbol-myristate-acétate
PPAR $\gamma$	<i>Peroxisome proliferator activated receptor gamma</i>
PPRE	Élément de réponse à PPAR $\gamma$
PTP	Protéine tyrosine phosphatase
PTPN6	<i>Protein tyrosine phosphatase non receptor 6</i>
RANTES	<i>Regulated on activation, normal T cell expressed and secreted</i>
ROS	Espèces réactives d'oxygène
RXR	Récepteur X de l'acide rétinoïque
SREBP-1C	<i>Sterol regulatory element-binding proteins-1c</i>
SGLT-2	Transporteur rénal de sodium/glucose 2
Shp1	<i>Src homology region 2 domain-containing phosphatase-1</i>
SEM	<i>Standard error of the mean</i>
SPPARM	Modulateurs spécifiques de PPAR $\gamma$
SH2	<i>Scr-homology 2</i>
TG	Triglycéride
TNF- $\alpha$	<i>Tumor necrosis factor</i>

TZD      Thiazolidinedione

WT      *Wildtype*

# Remerciements

Tout d'abord, un merci tout spécial à mon directeur de recherche, André Marette, qui m'a permis de poursuivre un cheminement particulier et sur mesure pour ma maîtrise. Merci André pour tes précieux conseils et ton support durant ces dernières années. Je ne pourrai jamais remercier assez les membres de « l'équipe Shp1 », Kerstin Bellman, Michael Schwab et Marie-Pier Forest qui ont été plus qu'essentiels à la réalisation de mes travaux. Merci pour votre soutien inébranlable, votre travail exemplaire, vos connaissances sans faille et la confiance que vous m'avez accordée pour la réalisation de ce projet. Merci Marie-Pier, ma *partner* et mon amie, sans qui ce projet aurait été bien différent! On ne peut rêver d'une meilleure coéquipière! Tu m'as permis de me dépasser au labo tout comme dans ma vie personnelle. Ton efficacité n'a pas d'égal! Merci aussi aux autres membres du laboratoire qui m'ont aidée dans la réalisation de mon projet : Bruno Marcotte, Patricia Mitchell, Marie-Julie Dubois, Philippe St-Pierre, Geneviève Pilon, Valérie Dumais, Christine Dion, Christine Dallaire, Joanie Morissette. Merci à tous les autres membres du laboratoire que j'ai côtoyés et qui ont su mettre du soleil dans chacune de mes journées passées au laboratoire : Noémie, Mélanie, Marion, Laura, Renato, Fernando, Michaël, Geneviève, Lilian, Dominique, Lais, Ingrid,...

Merci à mes parents et aux membres de ma famille qui ont été derrière moi tout au long de ce projet. Merci maman et papa pour votre soutien, vos conseils et votre aide. Je n'aurais jamais réussi à traverser ces trois années sans vous! Vous m'avez aidée à mener à terme ce gros projet que j'ai entrepris il y a trois ans qui consistait, en plus de ma maîtrise, à compléter mon pré-clinique en médecine et à terminer mes cinq années avec l'équipe d'athlétisme du Rouge et Or. Merci Isa et Eve-Ma, vous êtes mes inspirations et mes modèles à chaque jour.

Merci Alexandre, toi qui a toujours été derrière moi, qui a accepté de m'accompagner dans ma chasse vers de plus grands défis. Je n'y serais pas arrivé sans toi ! Merci pour ton support quotidien, ton optimisme et ton amour.

Merci à Manue pour ce sprint final! Tu as été mon rabbit pour le dernier droit! Ton énergie m'a été d'une grande aide!

## Avant-propos

Ce mémoire débute avec une revue générale des connaissances (Chapitre 1) qui sont les assises du projet qui est présenté par la suite (Chapitre 2). Ce projet a mené à la rédaction d'un article qui sera très bientôt soumis auprès d'une revue scientifique. Toutes les expérimentations ont été réalisées par moi-même et Marie-Pier Forest, également étudiante à la maîtrise dans l'équipe Marette. J'ai effectué les expériences dans les cellules HepG2 alors que Marie-Pier était responsable d'effectuer celles dans les HEK293T. Nos expérimentations ont été supervisées par Kerstin Bellman et Michael Schwab. Une partie des travaux a nécessité des collaborations avec l'Institut de Biologie Intégrative et des Systèmes (IBIS) de l'Université Laval ainsi qu'avec la plateforme de protéomique du centre de Génomique du CHU de Québec. J'ai réalisé la rédaction initiale de l'article ainsi que la création des figures. Le devis expérimental, l'interprétation des résultats ainsi que la révision du manuscrit ont été réalisés conjointement par les auteurs.

Marie-Pier Forest et moi seront premières coauteures de l'article présenté sous la direction d'André Marette.

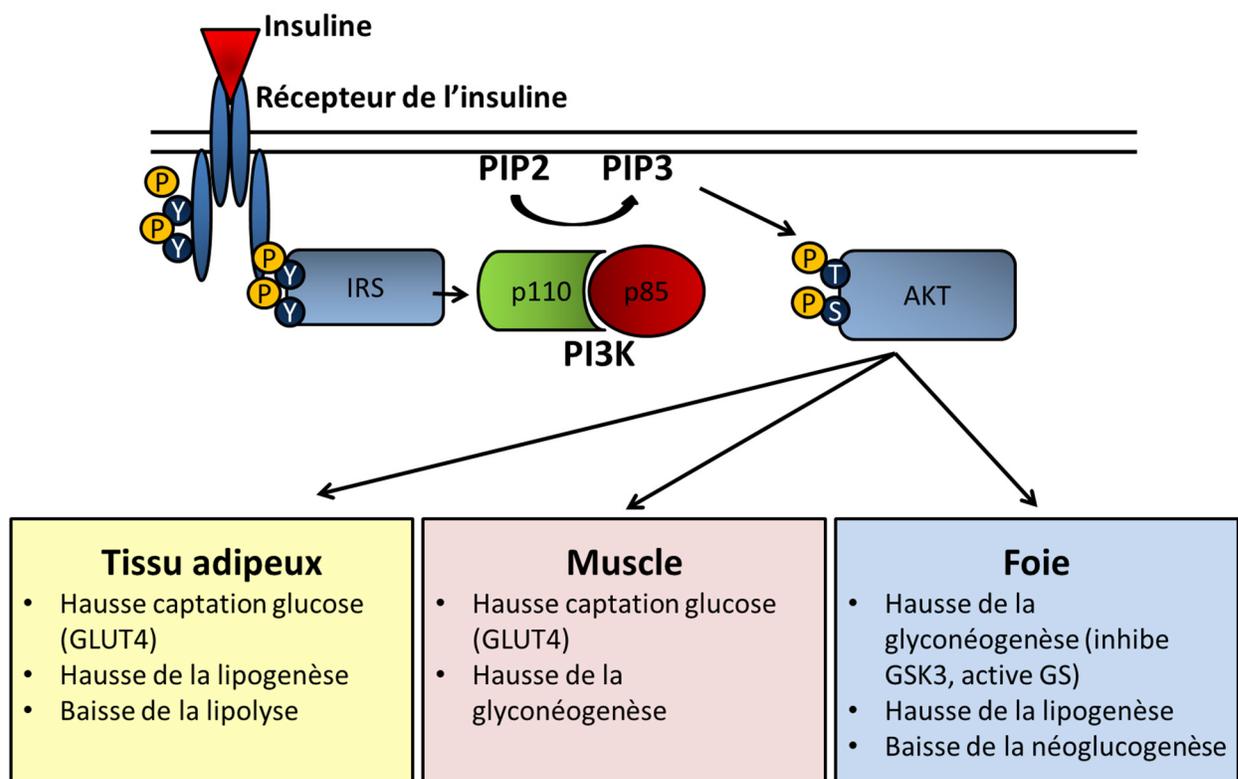
# Chapitre 1 : Introduction

La santé et la maladie sont deux concepts constamment en évolution. Contrairement au début du siècle où les maladies produisant le plus de victimes étaient les infections transmissibles, aujourd'hui ce sont les maladies chroniques sociétales qui causent le plus de décès <sup>1, 2</sup>. Faisant plus que simplement s'adapter à son environnement, l'homme a adapté son milieu à son mode de vie avec beaucoup de succès, lui permettant ainsi d'avoir accès à d'énormes quantités d'énergie tout en limitant ses propres dépenses énergétiques. Toutefois, c'est désormais ce mode de vie qui le rend malade. Le concept de santé s'est aussi transformé au fil du temps. Alors que l'évolution a sélectionné les individus capables d'emmagasiner efficacement l'énergie, ce qui les protégeait en période de famine, aujourd'hui les individus ayant de telles capacités sont plutôt désavantagés considérant l'abondance de sources nutritionnelles d'énergie jumelée à la non-nécessité de faire des réserves <sup>3</sup>.

Le métabolisme énergétique des organismes se doit d'être finement régulé pour assurer une gestion optimale des apports et des dépenses énergétiques. Les glucides, les lipides et les protéines seront utilisés comme sources d'énergie selon les besoins. Facilement mobilisables et pouvant être mis en réserves sous forme de glycogène, les glucides sont sans aucun doute les macronutriments énergétiques par excellence. Les sucres provenant de l'alimentation sont réduits en monomères par les différentes enzymes digestives. La résultante du bolus de glucides ingéré est constituée à 80% de glucose, 10% de fructose et 10% de galactose <sup>4</sup>. Le glucose correspond ainsi à une part importante des molécules énergétiques qui atteindront les cellules du corps. De plus, certaines cellules, dont les cellules neuronales, n'utilisent que le glucose comme source d'énergie principale <sup>5</sup>. La concentration de glucose plasmatique se doit donc d'être soumise à une fine régulation. La glycémie est principalement contrôlée par une balance entre différentes hormones dont les deux principales sont l'insuline et le glucagon. Le pancréas exerce un rôle central dans le maintien de la glycémie. Le pancréas possède des îlots de cellules endocrines formés de cellules alpha et bêta. Les cellules alpha sécrètent le glucagon en situation de jeûne ou lorsque la glycémie diminue. Les cellules bêta produisent l'insuline lorsque la glycémie s'élève en situation postprandiale. Plusieurs tissus répondent à la stimulation par l'insuline dont le muscle, le tissu adipeux et le foie.

À cause de leur taille, les molécules de glucose nécessitent des transporteurs spécifiques puisqu'elles ne peuvent traverser les membranes cellulaires par diffusion. Une cascade moléculaire, activée par l'insuline, est donc nécessaire pour permettre au glucose d'atteindre son transporteur à la membrane cellulaire. L'insuline est une hormone anabolique qui, lorsqu'elle se lie à son récepteur (IR), déclenche une cascade moléculaire menant à l'internalisation des molécules de glucose et ainsi à la diminution de la glycémie. L'IR est une protéine tétramérique transmembranaire <sup>6</sup>. Son activation par la fixation de l'insuline cause un changement

dans sa conformation qui mène à son auto-phosphorylation par son activité tyrosine kinase <sup>6</sup>. La phosphorylation des résidus tyrosine permet de créer des nouveaux sites de liaisons pour d'autres protéines. Différents substrats du récepteur de l'insuline (IRS) peuvent ainsi se lier au récepteur phosphorylé pour être phosphorylés à leur tour sur leurs résidus tyrosine. Ces résidus phosphorylés créent des sites auxquels pourront venir se lier différents substrats portant des domaines *Scr-homology 2* (SH2) ou des domaines de liaison phospho-tyrosine (PTB) <sup>7, 8</sup>. Parmi les substrats de l'IRS, se trouve la sous-unité inhibitrice p85 de la protéine phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K), une kinase ciblant les phospholipides membranaires. En se liant avec elle, l'IRS inhibe p85 et permet d'activer la sous-unité p110 de la protéine PI3K. La PI3K activée phosphoryle le phosphatidylinositol (4,5)-bisphosphate (PIP2) pour former du phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate (PIP3) <sup>9</sup>. Le PIP3 déclenche plusieurs cascades moléculaires dont celle menant au recrutement de la protéine sérine-thréonine kinase AKT/protéine kinase B (PKB) à la membrane <sup>10</sup>. L'activation d'AKT enclenche plusieurs événements qui varient selon le tissu ciblé par l'insuline (figure 1).



**Figure 1.1 :** Cascade moléculaire déclenchée par la liaison de l'insuline à son récepteur et menant à l'activation d'AKT qui entraîne différents processus anaboliques qui varient selon le tissu ciblé.

Dans le muscle, l'activation d'AKT entraîne la translocation à la membrane des transporteurs GLUT4 favorisant ainsi l'entrée du glucose dans les cellules <sup>7</sup>. L'insuline augmente la formation de glycogène à la fois par la phosphorylation et l'inhibition de la glycogène synthase kinase 3 (GSK3) qui mène à l'activation de la glycogène synthase (GS) <sup>7</sup>. L'insuline favorise également l'entrée des acides aminés dans les myocytes ainsi que la synthèse protéique tout en inhibant la protéolyse. Dans le tissu adipeux, en plus de causer la translocation de GLUT4 à la membrane, l'insuline augmente la captation des acides gras. Le glucose capté sera transformé en glycérol puis couplé aux acides gras pour former des molécules de triacylglycérol (TG) qui permettent de stocker une grande quantité d'énergie dans peu d'espace. L'insuline stimule également la lipoprotéine lipase (LPL) ce qui augmente la lipolyse des triglycérides en acides gras et l'entrée de ces derniers dans les adipocytes <sup>11</sup>. L'insuline favorise ainsi la lipogénèse et le stockage des lipides sous forme de triglycérides intracellulaires. Au niveau pancréatique, l'insuline inhibe la production de glucagon par les cellules alpha.

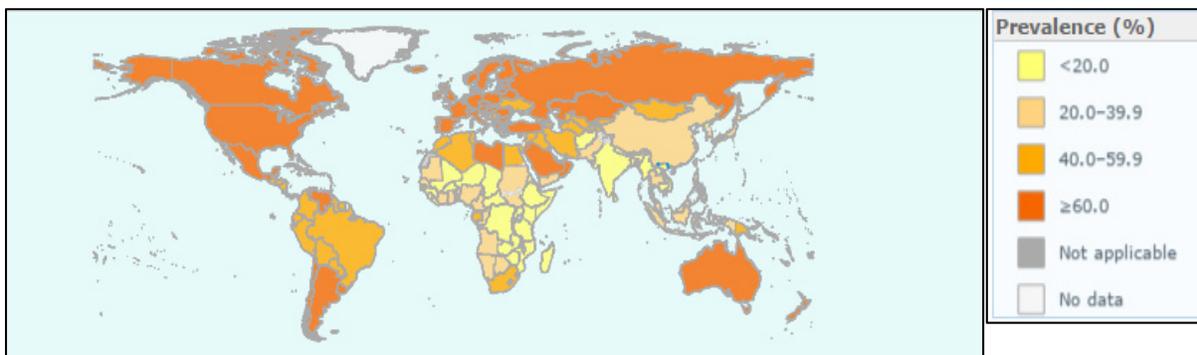
Le foie joue un rôle capital dans le contrôle du métabolisme énergétique. L'insuline a donc de nombreux effets sur cet organe. Il faut toutefois noter que le foie ne possède pas de transporteur GLUT4, mais plutôt des transporteurs GLUT2 qui sont non régulés par l'insuline et qui ont une affinité moins grande pour le glucose. Ceci permet au foie d'agir comme senseur de la glycémie. Dans le foie, tout comme dans le muscle, l'activation d'AKT par l'insuline inactive la GSK3 ce qui mène au stockage de glucose sous forme de glycogène. L'insuline a aussi pour effet de bloquer la néoglucogénèse et d'inhiber la glycogénolyse <sup>11</sup>.

Il est primordial que la voie de signalisation de l'insuline soit étroitement régulée. Son activation ne doit pas perdurer une fois la glycémie normalisée. L'arrêt de la cascade de l'insuline est donc étroitement régulée. Diverses protéines phosphatases sont ainsi impliquées dans la terminaison du signal par la déphosphorylation des protéines activées <sup>6</sup>.

La régulation métabolique fine et précise permet de répondre aux variations quotidiennes des apports et des dépenses énergétiques de façon optimale. Toutefois, la capacité du corps à répondre à ces variations est limitée. Ainsi, certaines situations qui entraînent soit des déséquilibres trop importants soit des déséquilibres de moindre ampleur, mais qui perdurent dans le temps, peuvent surpasser les mécanismes de régulation énergétique. Des débalancements, même très minimes, qu'ils soient intrinsèques en provenant par exemple d'un défaut génétique dans une voie métabolique ou extrinsèques par un apport alimentaire favorisant un type de nutriment aux dépens d'un autre, peuvent avoir des conséquences importantes sur la santé de l'individu.

## L'obésité

Ainsi, face à l'augmentation des aliments à haute densité énergétique conjointement à la diminution des niveaux d'activité physique dans les populations, l'obésité est subséquentement devenue un problème planétaire. En effet, l'obésité, autrefois réservée aux pays mieux nantis, touche de plus en plus les pays sous-développés et en développement et se répand sur le globe à grande vitesse <sup>12</sup>. L'obésité a presque doublé entre 1980 et 2008 où près de 500 millions d'adultes présentaient du surpoids dans le monde (figure 2) <sup>12</sup>. De plus, le temps nécessaire aux déséquilibres métaboliques pour se mettre en place et causer de l'embonpoint semblait favoriser l'apparition de l'obésité chez l'adulte plutôt que chez l'enfant. Toutefois, cette protection ne tient plus et les enfants sont désormais touchés de façon très importante par l'obésité et ses complications. En effet, selon l'Organisation mondiale de la Santé (OMS) <sup>12</sup>, en 2013, dans le monde, plus de 42 millions d'enfants âgés de moins de cinq ans étaient en surpoids.



**Figure 1.2** : Prévalence (%) du surpoids chez les adultes (18 ans et plus) selon les données collectées par l'Organisation mondiale de la Santé entre 2010 et 2014. Adapté de *WHO Overweight and Obesity* <sup>13</sup>.

L'obésité est désormais un enjeu prioritaire pour la majorité des sociétés. De nombreuses maladies ont été associées à l'obésité tels le diabète de type 2, les maladies cardiovasculaires et même certains cancers <sup>14</sup>. Chaque année, l'obésité et le surpoids seraient responsables d'environ 2,8 millions de décès <sup>12</sup>. L'ampleur de ce problème engendre également des coûts importants pour les sociétés. En effet, entre 2 et 7% des budgets de santé des pays industrialisés seraient destinés à défrayer les coûts directs et indirects liés à l'obésité <sup>15</sup>. Au Québec, l'obésité coûterait 3 milliards de dollars par année alors qu'au Canada, il en coûterait 30 milliards par an <sup>15</sup>.

La définition de l'obésité comporte également une certaine confusion. En effet, l'évaluation de l'obésité est généralement faite par la mesure de l'indice de masse corporelle (IMC) définie par la masse en kilogrammes divisée par la taille en mètres carrés. C'est d'ailleurs la mesure préconisée par l'OMS <sup>12</sup>. Toutefois, il est bien

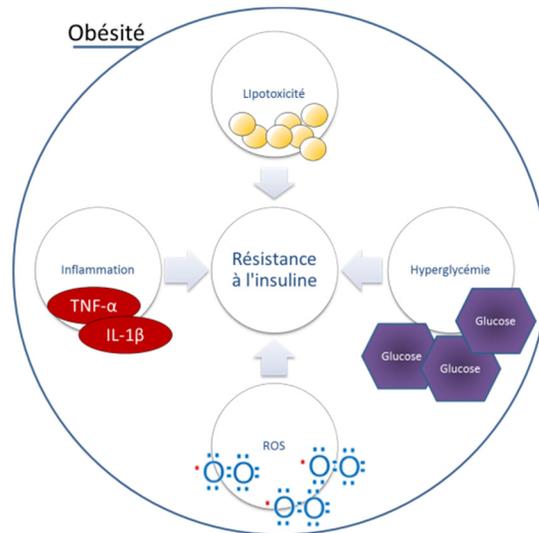
connu désormais que l'IMC ne permet pas de distinguer les différents types d'obésité qui ont pourtant des niveaux de risques différents pour la santé <sup>14</sup>. Ainsi, deux types de distribution des graisses ont été décrits : soit la forme androïde et la forme gynoïde <sup>16</sup>. La forme androïde, retrouvée plus fréquemment chez l'homme et la femme post-ménopausée, correspond à une accumulation de tissu adipeux viscéral au niveau abdominal. Elle est associée à des risques élevés de maladies <sup>14</sup>. La forme gynoïde correspond plutôt à un stockage des graisses au niveau des hanches et des fesses dans les dépôts adipeux sous-cutanés et est présente plus fréquemment chez la femme pré-ménopausée. Elle est aussi associée à un meilleur profil métabolique et à de moins grands risques pour la santé. Étant donné que ces impacts importants de la distribution des graisses sur la santé ne peuvent être détectés par l'IMC seul, il a été proposé de coupler la mesure de l'IMC à celle du tour de taille <sup>17</sup>. Cela permet ainsi de détecter, pour un même IMC, les différents profils de distribution de graisses et leur niveau de dangerosité pour la santé.

Comme mentionné précédemment, les dépôts de gras viscéraux ont été démontrés comme étant plus dommageables pour la santé que les dépôts sous-cutanés <sup>18, 19</sup>. De plus, il a été proposé que le tissu adipeux viscéral soit un marqueur d'un dysfonctionnement du tissu adipeux sous-cutané qui apparaît lorsque ce dernier est débordé par les grandes quantités de lipides qui affluent <sup>18, 20</sup>. En plus de s'accumuler dans les réserves de gras viscéral, ces lipides iront se déposer un peu partout dans l'organisme au niveau des vaisseaux et des organes tels les muscles ou le foie. Les lipides de ces dépôts ectopiques sont toxiques et altèrent le fonctionnement des organes <sup>21</sup>. En présence d'un grand apport en lipides, le tissu adipeux viscéral s'hypertrophie <sup>18</sup>. Il est moins sensible à l'inhibition de la lipolyse par l'insuline que le tissu adipeux sous-cutané <sup>22</sup>. Il s'ensuit donc un taux de lipolyse élevé <sup>22</sup>. Ceci augmente les niveaux d'acides gras circulants. En plus des acides gras circulants élevés, les individus ayant un taux élevé de gras viscéral présentent des niveaux abaissés de lipoprotéines à haute densité (HDL), des lipoprotéines à basse densité (LDL) petites et denses ainsi que des niveaux plus élevés de TG <sup>23</sup>. Il a été démontré que la présence anormale d'acides gras dans les tissus a un effet pro-inflammatoire <sup>24</sup>. Le tissu adipeux viscéral produit davantage de cytokines pro-inflammatoires tels l'interleukine 1-bêta (IL-1 $\beta$ ), l'interleukine 6 (IL-6) et le *tumor necrosis factor* (TNF)  $\alpha$  et moins de molécules anti-inflammatoires, comme l'adiponectine et l'interleukine 10 (IL-10) que le tissu adipeux sous-cutané <sup>19, 25</sup>. De plus, le tissu adipeux viscéral produit une molécule chimio-attractive, la MCP-1, qui attire les macrophages qui produiront à leur tour des molécules pro-inflammatoires <sup>26</sup>. Ce type d'obésité cause donc un état d'inflammation modérée, mais chronique.

## **La résistance à l'insuline**

Comme mentionné précédemment, la cascade de signalisation de l'insuline se doit d'être finement régulée. Il arrive toutefois que la réponse des organes à l'insuline soit altérée, comme chez les individus possédant des mutations des gènes impliqués dans cette voie métabolique. Ces individus développent rapidement une

résistance à l'insuline très sévère <sup>6</sup>. Les mutations génétiques ne peuvent toutefois expliquer la présence de résistance à l'insuline chez les personnes en surpoids ou obèses <sup>27, 18</sup>. Différents mécanismes ont été proposés pour tenter d'expliquer la réponse anormale des tissus face à l'insuline dans un environnement d'obésité : la lipotoxicité, l'inflammation, l'hyperglycémie et la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) (figure 3).



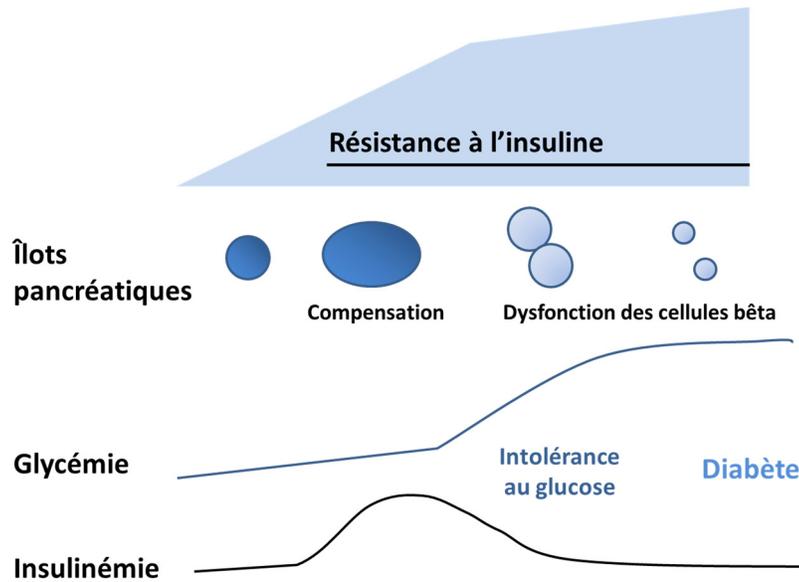
**Figure 1.3 :** Énumération non exhaustive des mécanismes impliqués dans la mise en place de la résistance à l'insuline. L'augmentation des acides gras libres circulants, de la glycémie, des cytokines pro-inflammatoires et des radicaux libres participe à la mise en place de la résistance à l'insuline.

Lorsque le tissu adipeux se retrouve débordé par l'arrivée trop importante d'acides gras libres provenant de l'alimentation, ces lipides sont réorientés dans la circulation et se déposent dans des organes non spécialisés dans le stockage des lipides tels le foie, le muscle, le cœur et le pancréas <sup>28</sup>. Les cellules de ces organes peuvent gérer une certaine accumulation de lipides par des mécanismes tels l'exportation hépatique de triglycérides ou l'oxydation des acides gras <sup>28</sup>. Toutefois, ces mécanismes adaptatifs sont rapidement dépassés si l'afflux d'acides gras perdure. L'accumulation d'acides gras non oxydés et de leurs métabolites, tels les céramides, dans le muscle, le foie, le cœur et le pancréas diminue la réponse de ces tissus à l'insuline. Ces métabolites inhibent la cascade de signalisation de l'insuline, entre autres, en causant l'augmentation de la phosphorylation de la sérine 307 du IRS, ce qui diminue sa liaison avec PI3K, ou en diminuant l'activation d'AKT <sup>29, 30, 31</sup>. L'inflammation chronique et de bas grade présente dans l'obésité participe également à diminuer la réponse des tissus à l'insuline notamment en activant des protéines sérine-thréonine kinases qui inhibent la transduction du signal de l'insuline <sup>32</sup> et en diminuant directement l'expression d'IRS-1 ou de GLUT4 <sup>33</sup>. D'autres protéines qui sont des régulateurs négatifs du signal de l'insuline ont également été

ciblées à cause de leur potentiel à freiner la cascade moléculaire. Ainsi il a été démontré que l'expression de certaines phosphatases est augmentée dans la résistance à l'insuline<sup>34, 35</sup>. À la longue, la résistance à l'insuline cause un état hyperglycémique qui altère, lui aussi, la sensibilité des tissus à l'insuline. Les concentrations élevées de glucose causent le phénomène de glycation non enzymatique des protéines. Le glucose se lie aux molécules pour créer des produits terminaux de glycation qui sont nocifs pour les cellules<sup>36</sup>. Il a été démontré que les produits de glycation inhibent l'activation d'AKT<sup>36</sup>. L'obésité cause l'augmentation du stress oxydatif. Dans l'obésité, les radicaux libres dérivés de l'oxygène sont produits de façon plus abondante notamment par la lipolyse plus importante qui en libère de grandes quantités, par l'infiltration du tissu adipeux par les macrophages qui produisent aussi des espèces réactives d'oxygène (ROS) et possiblement par les mitochondries dont la fonction est altérée dans l'obésité ce qui contribue à l'accumulation des radicaux libres<sup>37, 38, 39, 40</sup>. En plus de la hausse de production de ROS, la capacité oxydante des tissus est diminuée dans l'obésité à cause de la baisse d'activité des enzymes oxydantes comme la superoxyde dismutase, la catalase et la glutathione peroxydase<sup>41</sup>. La hausse des ROS freine le signal intracellulaire déclenché par l'insuline<sup>42</sup>. Il a aussi été démontré que l'obésité augmente les niveaux d'oxyde nitrique (NO) en haussant l'expression de la *inducible nitric oxide synthase* (iNOS) qui a un effet pro-inflammatoire<sup>43</sup>. Les niveaux cellulaires élevés de NO engendrent des modifications post-traductionnelles sur des sites protéiques ou lipidiques spécifiques<sup>44</sup>. Les effets du NO sur les acides aminés sont la nitration des résidus tyrosine et la S-nitrosylation des thiols des résidus cystéines des protéines<sup>45</sup>. La réaction entre le NO avec les anions superoxydes forme des molécules de peroxynitrite (ONOO<sup>-</sup>) qui sont de puissants agents nitrants<sup>44</sup>. Ces modifications post-traductionnelles ciblant les résidus tyrosine et cystéine peuvent avoir comme effet d'augmenter ou de diminuer la fonction de la molécule ciblée. Au niveau des protéines impliquées dans la cascade de l'insuline, pour lesquelles la phosphorylation des résidus tyrosine constitue un important mécanisme de régulation, ces modifications interfèrent avec le signal de l'insuline et mènent à la résistance à l'insuline entre autres au niveau du foie et du muscle<sup>44, 45, 46</sup>.

Ces altérations de la transduction intracellulaire du signal de l'insuline rendent les tissus insensibles à ce signal anabolique. La captation du glucose par le muscle et le tissu adipeux est diminuée, ce qui participe à l'augmentation de la glycémie. Le muscle diminue également son utilisation du glucose et la synthèse de glycogène<sup>47</sup>. Le tissu adipeux réduit aussi la quantité d'acides gras qu'il capte et augmente, au contraire, la lipolyse d'acides gras qui seront libérés en plus grande quantité dans la circulation<sup>48</sup>. Le foie participe aussi à maintenir un état hyperglycémique en augmentant la glycogénolyse ainsi que la néoglucogenèse ce qui libère plus de glucose dans la circulation<sup>47</sup>. Le foie augmente également sa production de VLDL<sup>20</sup>. Le pancréas tente de produire de plus grandes quantités d'insuline pour pallier à la perte de sensibilité des tissus à l'insuline. Toutefois, au-dessus d'une certaine concentration, les niveaux élevés de glucose sanguin inhibent la

production pancréatique d'insuline <sup>49</sup>. Les cellules bêta du pancréas finissent par s'épuiser à force de produire d'énormes quantités d'insuline <sup>50</sup>. De plus, les produits toxiques dérivés des lipides mènent à l'apoptose des cellules pancréatiques productrices d'insuline <sup>51</sup>. La cascade signalétique déclenchée par l'insuline ne suffit plus à maintenir la glycémie dans les valeurs normales et celle-ci s'élève sans toutefois dépasser le seuil permettant de poser le diagnostic de diabète; c'est le stade de l'intolérance au glucose (figure 4).



**Figure 1.4 :** Mise en place du diabète en allant d'un fonctionnement normal des cellules bêta du pancréas, à l'intolérance au glucose et au diabète. La compensation par les îlots de cellules bêta permet d'abord d'hausser la sécrétion d'insuline, mais est suivie par une décompensation des cellules bêta pancréatiques qui mène à la diminution de sécrétion d'insuline et aggrave l'hyperglycémie. Inspiré de Notes de Cours SBM-2014 <sup>52</sup>.

## Diabète

Le diabète de type 2, aussi appelé diabète sucré ou diabète non insulino dépendant, apparaît lorsque la résistance à l'insuline perdure et que la production d'insuline par les cellules bêta du pancréas ne suffit plus à maintenir la glycémie et qu'elle s'élève pour égaler ou dépasser 7 mmol/L à jeun. Le glucose s'accumule alors dans la circulation sanguine et l'hyperglycémie qui s'ensuit est néfaste pour plusieurs organes.

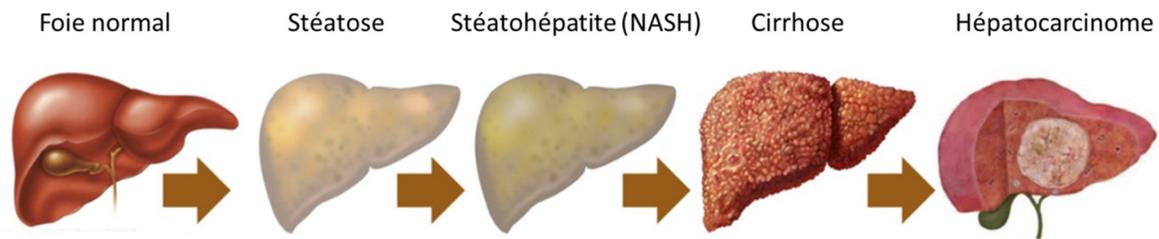
La prévalence du diabète est en hausse partout sur la planète à l'instar de celle de l'obésité. Même si tous les éléments qui sous-tendent ces deux troubles métaboliques n'ont pas été clairement identifiés, il est désormais reconnu que diabète et obésité sont fortement liés <sup>1, 53</sup>. Le surpoids et l'obésité ont été identifiés comme étant les facteurs de risque principaux pour le développement du diabète <sup>1, 53</sup>. Le nombre d'individus atteints de diabète a quadruplé entre 1980 et 2014, les pays en voie de développement étant ceux ayant connu la hausse la plus marquée <sup>54</sup>. Selon l'OMS, en 2014, 422 millions d'individus étaient diabétiques <sup>55</sup>. Tout comme

l'obésité, le diabète est un fardeau économique et un enjeu de santé planétaire important, entraînant directement 1,5 millions de décès en 2012 <sup>55</sup>. Plusieurs décès s'ajoutent à ce nombre en incluant ceux causés par les maladies liées au diabète.

À long terme, l'élévation constante de la glycémie, combinée à tous les déséquilibres accompagnant la résistance à l'insuline détaillés précédemment, est très néfaste pour les organes. Parmi les complications les plus courantes du diabète de type 2 se trouvent entre autres les atteintes des petits vaisseaux de la rétine, du cœur, du foie, des reins et des extrémités <sup>56, 57, 58, 59, 60</sup>. Le diabète de type 2 était la cause de 2,6% des cas de cécité dans le monde en 2010 et ce pourcentage est en augmentation dû au vieillissement de la population <sup>56</sup>. Le diabète augmente également les risques de maladies vasculaires tels la maladie coronarienne et les accidents vasculaires cérébraux (AVC) <sup>57</sup>. L'atteinte des reins mène éventuellement à l'insuffisance rénale <sup>58</sup>. Les patients diabétiques peuvent également souffrir d'une perte de sensibilité des extrémités, aussi appelée « en gants et chaussettes » <sup>61</sup>. La perte de sensibilité couplée à la mauvaise vascularisation augmentent le risque de plaies qui ont tendance à s'infecter davantage <sup>59, 54</sup>. Le diabète augmente de 10 à 20 fois le risque d'amputation <sup>59, 54</sup>.

## **NAFLD**

Une autre condition associée à la présence de l'obésité et du diabète de type 2 est la stéatose hépatique non alcoolique (NAFLD) <sup>62, 63</sup>. Même si les mécanismes qui relient la NAFLD et le diabète ne sont toujours pas complètement élucidés, des études ont démontré que le diabète augmentait de façon significative le risque et la sévérité de la NAFLD <sup>64</sup>. L'accumulation anormale de TG au niveau des hépatocytes suite à la présence d'une résistance à l'insuline a été identifiée comme cause possible pouvant mener à la stéatose hépatique chez les diabétiques <sup>63</sup>. Cette accumulation de lipides hépatiques est, entre autres, le résultat d'une augmentation de la captation de lipides et de la lipolyse couplées à une diminution de l'oxydation des acides gras libres et de l'exportation des TG <sup>65, 60</sup>. Les TG qui s'accumulent dans la cellule induisent la production de ROS par la mitochondrie menant ainsi à la peroxydation des lipides et à la production de cytokines pro-inflammatoires <sup>63, 66, 67</sup>. La stéatose hépatique est réversible. Toutefois, si l'inflammation s'élève, la stéatose hépatique peut entraîner une hépatite <sup>63</sup>. Si l'agression cellulaire perdure, la fibrose peut apparaître et atteindre l'architecture hépatique pour mener à la cirrhose (figure 5).



**Figure 1.5 :** Progression de la stéatose hépatique vers la cirrhose hépatique. Le potentiel de réversibilité de la condition hépatique diminue de la gauche vers la droite. 20 à 30 % des patients présentant de la stéatose hépatique évolueront vers la NASH et, de ces-derniers, 3% développeront une cirrhose. Adapté de Baffy et collaborateurs <sup>68</sup>.

La cirrhose est une pathologie grave, ayant peu de potentiel de réversibilité et pouvant mener au dysfonctionnement hépatique. La cirrhose augmente les risques de développement d'hépatocarcinome <sup>69</sup>. La NAFLD regroupe un spectre de présentations, allant de la simple stéatose à la cirrhose, dont l'évolution est très variable. En effet, certains individus verront une amélioration de leur condition alors que d'autres auront un état stable ou évolueront plutôt vers la cirrhose hépatique <sup>65</sup>. Environ 20 à 30 % des patients présentant de la stéatose hépatique évolueront vers la stéatohépatite non alcoolique (NASH) et, de ces-derniers, 3% développeront une cirrhose <sup>69, 70, 65</sup>. La stéatose hépatique est souvent découverte fortuitement par l'élévation des enzymes hépatiques, soit l'alanine aminotransférase et l'aspartate aminotransférase (AST et ALT), chez un patient asymptomatique. Les seuls symptômes accompagnateurs présents peuvent être de la fatigue, de la léthargie ainsi qu'un inconfort à l'hypochondre droit <sup>63</sup>. L'amélioration des habitudes de vie ainsi qu'une réduction de l'hypertension, de l'hyperglycémie et de la dyslipidémie se sont révélées être des moyens pouvant améliorer l'état des patients présentant de la NASH <sup>60</sup>.

## Traitements pharmacologiques du diabète et de la NAFLD

Plusieurs thérapies ont été mises sur le marché à tour de rôle, chacune comportant ses avantages et ses inconvénients. De façon très succincte, voici donc les principales molécules utilisées pour le traitement du diabète de type 2 (Tableau 1). Parmi les premières molécules mises sur le marché se trouvent les sulfonylurées. En se liant aux cellules bêta du pancréas, ces molécules augmentent la libération d'insuline par exocytose <sup>71</sup>. Les risques d'hypoglycémies sévères et le gain de poids associé à la prise de ces médicaments limitent leur utilisation <sup>72</sup>. Le mécanisme d'action des méglitinides est semblable à celui des sulfonylurées, c'est-à-dire qu'il augmente la sécrétion d'insuline par le pancréas, mais son action est plus rapide <sup>71</sup>. Quoiqu'il en soit, les risques d'hypoglycémies et la prise de poids sont à surveiller chez les

patients faisant l'usage des méglitinides <sup>73</sup>. Un autre médicament, utilisé depuis les années 50 dans le traitement du diabète, est la metformine qui est dérivée du lilas français <sup>71</sup>. Ce médicament est souvent utilisé en première ligne puisqu'il a différents effets dépendants et indépendants de l'insuline selon la concentration de metformine à laquelle sont exposées les cellules ciblées: intestinales, hépatiques, etc. <sup>71, 74</sup>. Elle augmente entre autres les niveaux de *glucagon-like peptide 1* (GLP-1) qui potentialise l'effet des nutriments alimentaires sur la sécrétion d'insuline et augmente ainsi de façon très importante sa libération <sup>71</sup>. La metformine augmente la sensibilité du foie et du muscle à l'insuline. La production de glucose par le foie est ainsi diminuée et la captation de glucose par le muscle est augmentée <sup>74</sup>. Les risques d'hypoglycémies sont bas, les seuls inconvénients étant souvent l'inconfort abdominal que peuvent ressentir certains patients <sup>75</sup>. Quelques années plus tard, sont apparus sur le marché les inhibiteurs de l'alpha-glucosidase ayant pour rôle de diminuer l'absorption du glucose alimentaire en retardant sa digestion dans la lumière intestinale <sup>76</sup>. Ayant un faible effet sur la baisse de la glycémie, les inhibiteurs de l'alpha-glucosidase sont surtout reconnus pour les inconforts abdominaux qu'ils causent <sup>71</sup>. Une autre classe de médicaments, les incrétines, incluant les inhibiteurs de la dipeptidyl peptidase-4 (DPP-4) et les agonistes du récepteur de GLP-1, ont aussi comme mécanisme d'action d'augmenter les niveaux d'insuline par la hausse de GLP-1 <sup>71</sup>. L'utilisation de ces molécules est associée à peu de risque d'hypoglycémie et à une perte de poids <sup>75</sup>. Les thiazolidinediones (TZD) sont pour leur part des agonistes du *peroxisome proliferator activated receptor gamma* (PPAR $\gamma$ ). L'activation de cette protéine, dont les rôles seront détaillés plus loin, réduit la production hépatique de glucose et dirige les lipides vers les dépôts adipeux sous-cutanés ce qui améliore le profil lipidique <sup>77, 78</sup>. Les effets secondaires des TZD, tels le gain de poids, caractérisé par une redistribution du tissu adipeux viscéral vers le tissu adipeux sous-cutané, l'œdème, les troubles cardiaques, les atteintes cardiaques et la hausse du risque de fracture, restreignent toutefois leur utilisation <sup>75</sup>. Plus récemment sont apparus sur le marché les inhibiteurs du transporteur rénal de sodium/glucose 2 (SGLT-2). Ces inhibiteurs bloquent la réabsorption du glucose au niveau du tubule proximal, augmentant ainsi le niveau de glucose excrété dans l'urine <sup>71</sup>. Les infections urinaires et génitales ainsi que l'hypotension sont à surveiller avec ces molécules. Une augmentation du risque de fracture aurait aussi été rapportée <sup>75</sup>. Puisque ces molécules sont arrivées récemment sur le marché, l'innocuité à long terme demeure à être établie. À ces traitements s'ajoute bien sûr l'insuline qui se doit d'être injectée. Aucun de ces traitements n'est optimal, c'est pourquoi beaucoup de recherches sont en cours pour mettre au point de nouvelles molécules qui pourront être administrées aux patients sur plusieurs années de façon sécuritaire.

**Tableau 1.1** : Classes de médicaments utilisés dans le traitement du diabète selon le risque d'hypoglycémie qu'elles engendrent, leur effet sur le gain ou la perte de poids et leurs effets indésirables. Adapté de Traitement pharmacologique du diabète de type 2 : mise à jour intérimaire 2016, Comité d'experts des Lignes directrices de pratique clinique de l'Association canadienne du diabète <sup>75</sup>.

Classe	Hypoglycémie	Poids	Autres effets secondaires
<b>Insuline</b>	oui	↑↑	
<b>Sécrétagogues de l'insuline:</b>			
<b>Sulfonylurées</b>	oui	↑	
<b>Méglitinide</b>	oui	↑	
<b>Metformine</b>	rare	↓	Effets gastro-intestinaux
<b>Inhibiteur de l'α-glucosidase</b>	rare	Sans effet à ↓	Effets gastro-intestinaux
<b>Incrétines:</b>			
<b>Inhibiteurs de la DPP-4</b>	rare	Sans effet à ↓	Effets gastro-intestinaux
<b>Agonistes des récepteurs GLP-1R</b>	rare	↓↓	Effets gastro-intestinaux
<b>Inhibiteurs du SGLT2</b>	rare	↓↓	Infections génitales ou urinaires, hypotension
<b>Thiazolidinediones</b>	rare	↑↑	Œdème, fractures, effets cardiovasculaires controversés

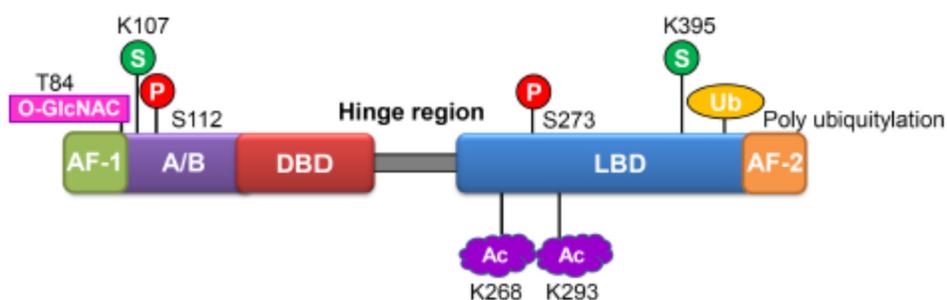
## PPAR<sub>γ</sub>

Comme mentionné précédemment, l'utilisation des TZD est désormais restreinte à cause de certains effets secondaires indésirables ayant des risques importants pour la santé des patients. Toutefois, ces molécules qui sont des agonistes de la protéine PPAR<sub>γ</sub> s'étaient révélées être très efficaces pour améliorer la glycémie et le bilan lipidique des patients. Plusieurs recherches sont donc en cours pour tenter de créer de nouvelles molécules capables de sélectionner uniquement les effets désirables de l'activation de PPAR<sub>γ</sub>.

La famille des *peroxisome proliferator activated receptor* (PPAR) a été découverte dans les années 90 comme étant des senseurs de lipides <sup>79</sup>. Trois protéines forment ce groupe de molécules impliquées dans la régulation de processus métaboliques : PPAR<sub>α</sub>, PPAR<sub>β/δ</sub> et PPAR<sub>γ</sub> <sup>80, 81</sup>. La première protéine identifiée fut la molécule PPAR<sub>α</sub> qui a donné le nom à la famille puisqu'elle stimule la prolifération des peroxisomes <sup>79</sup>. Elle est toutefois la seule protéine de la famille des PPAR à posséder cette capacité <sup>82</sup>. Bien que l'ensemble des PPARs soient des récepteurs nucléaires et des facteurs de transcription, leurs distributions tissulaires ainsi que leurs rôles sont différents <sup>82</sup>. La protéine PPAR<sub>α</sub>, retrouvée principalement au niveau du foie, du muscle et du cœur, joue un rôle dans l'oxydation des acides gras surtout en période de jeûne <sup>83, 84</sup>. Son activation permet notamment la production de corps cétoniques <sup>85</sup>. PPAR<sub>β/δ</sub> est exprimé de façon ubiquitaire et est plutôt impliqué dans le catabolisme des acides gras et dans la thermogénèse <sup>86</sup>. PPAR<sub>γ</sub>, pour sa part, est principalement retrouvé au

niveau des adipocytes, mais est également présent dans les hépatocytes, les entérocytes, les macrophages et les cellules musculaires<sup>87, 82, 88</sup>. Il existe deux isoformes de PPAR $\gamma$ , soit PPAR $\gamma$ 1 et PPAR $\gamma$ 2, qui diffèrent par leur nombre d'acides aminés et leurs localisations tissulaires. PPAR $\gamma$ 2 possède 28 acides aminés de plus à son extrémité N-terminale<sup>87</sup>. PPAR $\gamma$ 1 et PPAR $\gamma$ 2 possèdent ainsi 477 et 505 acides aminés respectivement<sup>87, 84</sup>. PPAR $\gamma$ 1 est plutôt ubiquitaire alors que PPAR $\gamma$ 2 se retrouve surtout au niveau du tissu adipeux et en moindre quantité au niveau du foie, du muscle squelettique et des macrophages<sup>89, 88</sup>.

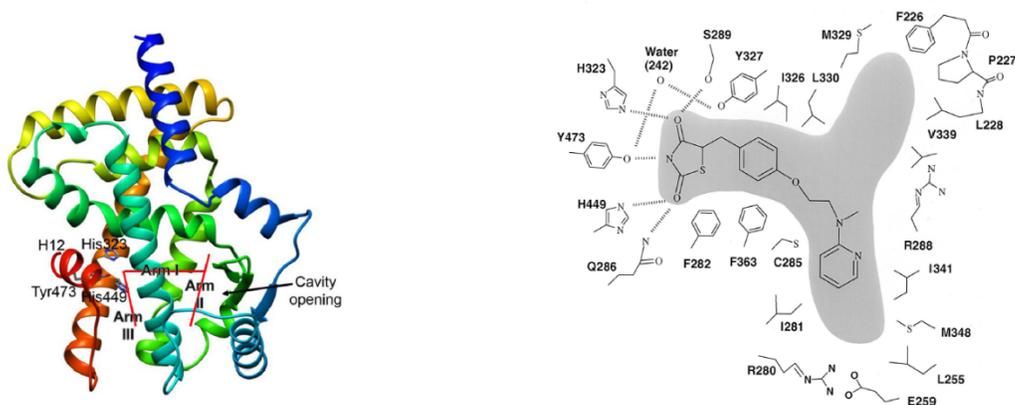
De sa région N-terminale vers son extrémité C terminale, PPAR $\gamma$  possède un domaine d'activation indépendant de la liaison au ligand (AF-1), un domaine de liaison à l'ADN (DBD), un domaine de liaison au ligand (LBD) et un domaine d'activation dépendant de la liaison du ligand (AF-2) (figure 6)<sup>84</sup>.



**Figure 1.6** : Structure linéaire de PPAR $\gamma$  portant les modifications post-traductionnelles dont le rôle a été détaillé dans la littérature. **Y**: tyrosine, **S**: serine, **P**: phosphorylation, **AF-1**: domaine d'activation indépendant de la liaison au ligand, **DBD**: domaine de liaison à l'ADN, **LBD**: domaine de liaison au ligand, **AF-2**: domaine d'activation dépendant de la liaison du ligand. Adapté de Choi et collaborateurs<sup>89</sup>.

Pour se lier à l'ADN, PPAR $\gamma$  doit former un hétérodimère avec le récepteur X de l'acide rétinoïque (RXR)<sup>90</sup>. C'est une région contenant plusieurs résidus hydrophobes du LBD qui est impliquée dans la liaison avec le RXR<sup>84</sup>. Une fois ce complexe assemblé, le domaine de liaison à l'ADN, formé de deux doigts de zinc, reconnaît une séquence de six nucléotides (AGGTCA) répétée deux fois et séparée par un ou deux nucléotides qui constitue l'élément de réponse à PPAR $\gamma$  (PPRE) au niveau du promoteur des différents gènes cibles<sup>90</sup>. Une fois repliée, PPAR $\gamma$  forme 13 hélices  $\alpha$  et quatre feuillets  $\beta$ <sup>91</sup>. La superposition des hélices forme le domaine de liaison au ligand qui est une large cavité en forme de « Y » ce qui lui permet de recevoir une grande variété de ligands (figure 7)<sup>91</sup>. Les acides aminés bordant la cavité de liaison au ligand forment

des liens hydrogènes avec ces derniers (figure 7)<sup>92, 93</sup>. La liaison d'un ligand stabiliserait et fixerait PPAR $\gamma$  dans une conformation lui permettant de recruter ses co-activateurs et de se libérer de ses co-répresseurs<sup>93</sup>.



**Figure 1.7 :** Structure tertiaire de la protéine PPAR $\gamma$  représentant les 13 hélices alpha et les quatre feuillets bêta (gauche). Cavité (gris) servant à la liaison au ligand dans le LBD occupée par la rosiglitazone (droite). Les traits reliant PPAR $\gamma$  à la rosiglitazone représentent des liens hydrogènes. Adapté de Lewis et collaborateurs<sup>94</sup> et Iwata et collaborateurs<sup>92</sup>.

PPAR $\gamma$  est essentiel et suffisant à l'adipogenèse<sup>95</sup>. Dans le tissu adipeux, il est impliqué dans le transport et le stockage des acides gras, entre autres, en régulant l'expression des gènes correspondant à des protéines responsables du transport des acides gras tels *adipocytes protein 2* (aP2), *cluster of differentiation 36* (CD36), *fatty acid synthase* (FAS) et *fatty acid transport protein 1* (FATP-1)<sup>96, 97, 78</sup>. PPAR $\gamma$  est aussi impliqué dans la réestérification des acides gras en triglycérides pour leur stockage par le biais de la hausse de l'expression ou de l'activité protéique de glycérol phosphate acyltransférase (GPAT), acylglycérolphosphate acyltransférase (AGPAT) et diacylglycérol acyltransférase (DGAT)<sup>78</sup>. PPAR $\gamma$  est associé à une redistribution des lipides des dépôts ectopiques vers les dépôts sous-cutanés, entre autres, à cause de son effet sur la LPL<sup>96, 78</sup>. L'activation de PPAR $\gamma$  permet ainsi d'améliorer le profil sanguin lipidique en retirant les acides gras de la circulation pour les stocker de façon stable et non dommageable dans le tissu adipeux. De plus, PPAR $\gamma$  possède des effets anti-inflammatoires. Son activation dans le tissu adipeux entraîne la production de molécules anti-inflammatoires telles l'adiponectine et diminue les molécules pro-inflammatoires comme le *tumor necrosis factor* (TNF- $\alpha$ )<sup>98, 99</sup>. PPAR $\gamma$  participe aussi à l'amélioration de la sensibilité à l'insuline ainsi qu'au transport du glucose. Dans le tissu adipeux et dans le muscle, son activation favorise la voie de signalisation de l'insuline et augmente la captation du glucose par la translocation de GLUT-4 à la membrane,<sup>100, 101, 102</sup>. Même si les niveaux hépatiques de PPAR $\gamma$  sont moindres que ceux du tissu adipeux, des effets

bénéfiques reliés à l'activation hépatique de PPAR $\gamma$  ont été identifiés <sup>103</sup>. Tout comme dans le muscle et le tissu adipeux, la signalisation de la voie de l'insuline est augmentée suite à l'activation de PPAR $\gamma$  <sup>104</sup>. De plus, il a été démontré que PPAR $\gamma$  hausse l'expression de GLUT2 ce qui entraîne la captation et la rétention de glucose par le foie <sup>105, 106</sup>. Aussi, l'activité hépatique de PPAR $\gamma$  engendre une diminution de la gluconéogenèse par le foie <sup>107</sup>. Ces deux phénomènes conduisent ainsi à la réduction de la glycémie et expliquent, en partie, le potentiel hypoglycémiant des TZD. La sécrétion hépatique de VLDL est également réduite à la suite de l'activation de PPAR $\gamma$  <sup>108</sup>.

Dans l'optique de déterminer les rôles de PPAR $\gamma$ , son invalidation a été testée dans différents tissus. D'abord les souris, dans lesquelles une déficience en protéine PPAR $\gamma$  est induite peu après leur naissance au niveau du tissu adipeux, présentent une diminution de leurs réserves adipeuses, de l'hyperlipidémie, de la stéatose hépatique et de la résistance à l'insuline <sup>109</sup>. L'absence de PPAR $\gamma$  au niveau du muscle des animaux induit de la résistance à l'insuline <sup>110</sup>. Dans les hépatocytes, l'invalidation de PPAR $\gamma$  cause l'élévation des taux plasmatiques de lipides, d'insuline et de glucose en plus d'augmenter l'adiposité des animaux <sup>111</sup>. La résistance à l'insuline est également induite par l'absence de la protéine au niveau des macrophages en plus d'une hausse des cytokines pro-inflammatoires IL-6 et IL-1 $\beta$  <sup>88</sup>. Ces différents modèles animaux démontrent bien que PPAR $\gamma$  joue à la fois des rôles dans le métabolisme du glucose, dans la régulation des lipides et dans la réduction de l'inflammation et que ces effets, même s'ils ne proviennent que de la délétion de PPAR $\gamma$  dans un seul type cellulaire, auront un impact sur les autres organes. Chez l'humain, les mutations qui diminuent l'activité de PPAR $\gamma$  sont associées à la lipodystrophie et au développement de résistance à l'insuline sévère <sup>112, 113, 114</sup>.

## Régulation de l'activité de PPAR $\gamma$

Il existe différents mécanismes de régulation de l'activité de PPAR $\gamma$  dont la liaison à différents ligands et cofacteurs ainsi que les modifications post-traductionnelles. La région AF-2 de PPAR $\gamma$  est responsable de la liaison avec les coactivateurs et les corépresseurs comme le corépresseur nucléaire NCoR ou le coactivateur récepteur de stéroïdes 1 (SRC1) <sup>115, 116</sup>. Différents ligands peuvent aussi se lier au LBD pour activer PPAR $\gamma$ . Plusieurs facteurs endogènes activent, tels certains acides gras, facteurs de croissance, ou inhibent, comme l'oxyde nitrique (NO), PPAR $\gamma$  <sup>117, 118, 119</sup>. Parmi les activateurs exogènes de PPAR $\gamma$ , se retrouvent les TZD. Comme mentionné précédemment, les TZD sont des activateurs spécifiques de PPAR $\gamma$  utilisés dans le traitement du diabète, mais dont l'usage est maintenant restreint à cause des effets indésirables rapportés. La rosiglitazone est sans aucun doute la mieux connue et la plus étudiée en lien avec son effet agoniste sur PPAR $\gamma$ . Lorsqu'elle se retrouve dans la cavité servant à lier les ligands au niveau du LBD de PPAR $\gamma$ , l'atome

d'azote de la rosiglitazone forme des liens hydrogènes avec des acides aminés spécifiques qui en bordent les pourtours <sup>92</sup>. Certains d'entre eux ont été identifiés comme étant essentiels à la liaison avec la rosiglitazone : l'histidine 323, l'histidine 449 et la tyrosine 473. La liaison avec la rosiglitazone entraîne un changement de conformation qui mène à la stabilisation de l'hélice  $\alpha$  12 ce qui permet la liaison des co-activateurs et la séparation d'avec les co-répresseurs <sup>91, 120</sup>.

Les modifications post-traductionnelles de plusieurs acides aminés de PPAR $\gamma$  se sont aussi révélées comme ayant une forte influence sur son activité. Des mécanismes de liaison de *small ubiquitin-like modifier* (SUMO), de phosphorylation sur sérine, d'ubiquitination et de déacétylation ont entre autres été identifiés <sup>89</sup>.

La SUMOylation représente une voie de régulation importante de l'activité de PPAR $\gamma$ . La SUMOylation de la lysine 107 diminue l'activité de PPAR $\gamma$  dans les adipocytes <sup>121</sup>. Il a été établi que le facteur de croissance fibroblastique 21 (FGF21) pouvait bloquer la SUMOylation de la lysine 107 et ainsi augmenter l'activité de la protéine <sup>119</sup>. De plus, la SUMOylation de la lysine 107 serait favorisée par la phosphorylation de la sérine 112 ce qui diminuerait l'activité de la protéine <sup>121, 122</sup>. La SUMOylation de la lysine 395 pour sa part diminue la transcription des gènes pro-inflammatoires dans les macrophages <sup>123</sup>.

PPAR $\gamma$  a une courte demi-vie et il est dégradé par le protéasome <sup>124, 125</sup>. L'ubiquitination de PPAR $\gamma$  a été démontré comme pouvant accélérer cette dégradation par le protéasome <sup>126</sup>. Les impacts de l'ubiquitination demeurent à être investigués plus en profondeur pour évaluer les impacts des différents états d'ubiquitination tels le nombre de molécules d'ubiquitines attachées à la protéine, le type cellulaire et les autres modifications post-traductionnelles environnantes <sup>125</sup>. L'ubiquitination de la lysine 160 a été rapportée, mais son rôle reste à être éclairci <sup>127</sup>.

Des analyses par spectrométrie de masse ont identifié la présence de méthylation sur la thréonine 487, mais l'effet de cette modification demande encore à être évalué <sup>127</sup>.

Beaucoup d'études ont documenté le rôle complexe de la phosphorylation de la sérine 112. L'effet de sa phosphorylation sur l'activité de la protéine dépend de la molécule effectrice et de la phase du cycle cellulaire. En effet, lorsque la phosphorylation de la sérine 112 est effectuée par la *mitogen-activated protein kinase* (MAPK), PPAR $\gamma$  voit son activité transcriptionnelle diminuée alors que l'inverse se produit lorsque la phosphorylation est produite par la kinase dépendante des cyclines (Cdk) 9 ou Cdk7 <sup>128, 129, 130</sup>. La phosphorylation de la sérine 273 par la Cdk 5 ou par la *extracellular signal-regulated kinase* (Erk) augmente l'expression de gènes pro-adipogéniques <sup>131</sup>. L'inhibition de cette phosphorylation, qui peut être faite par les

TZD ou par des inhibiteurs de la voie *mitogen-activated protein kinase kinase* (MEK)-Erk, a un effet anti-diabétique <sup>131</sup>.

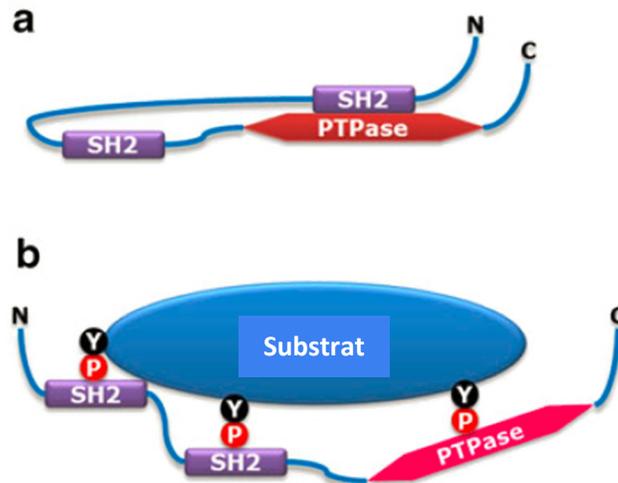
Le groupe de Keshet et collaborateurs a montré que la *nonreceptor tyrosine kinase Abelson murine leukemia viral oncogene* (c-Abl) augmente la stabilité de la protéine PPAR $\gamma$ 2 en phosphorylant les tyrosines 78 et 102 localisées dans le domaine AF-1 <sup>132</sup>. La phosphorylation de ces deux résidus permet à PPAR $\gamma$ 2 d'échapper à l'ubiquitination qui mène à sa dégradation par le protéasome <sup>132</sup>. À l'inverse, le groupe de Xu et collaborateurs a montré que la phosphorylation de la tyrosine 102 par le récepteur nucléaire du facteur de croissance épidermique (EGFR) favorise sa dégradation <sup>133</sup>. D'autres ont démontré que la phosphorylation de la tyrosine 78 par s-Src supprime l'expression des gènes pro-inflammatoires dans les adipocytes <sup>134</sup>.

Il a été démontré que l'expression génique du *peroxisome proliferator activated receptor gamma* (PPAR $\gamma$ ) ainsi que l'activité de la protéine PPAR $\gamma$  sont augmentés dans les hépatocytes en l'absence de la tyrosine phosphatase *Src homology region 2 domain-containing phosphatase-1* (Shp1) <sup>135</sup>. Ces résultats indiquent que Shp1 aurait un rôle à jouer dans la régulation de la protéine PPAR $\gamma$  qui pourrait être impliqué à la fois dans la résistance à l'insuline et dans le développement de la NAFLD.

## Shp1

La protéine Shp1 a été identifiée dans les années 90 <sup>136, 137</sup>. Shp1 est une protéine issue du gène *tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 6* (PTPN6) ayant une masse de 68 kDa. Shp1 possède deux domaines SH2 suivis d'un domaine catalytique tyrosine phosphatase à son extrémité carboxy-terminale <sup>137</sup>. La régulation de l'activité de la protéine se fait de différentes façons. La phosphorylation de résidus tyrosine et sérine augmente ou diminue l'activité de Shp1 selon le résidu ciblé et le type cellulaire <sup>138, 139</sup>. Ainsi, la tyrosine kinase Lyn augmente l'activité phosphatase de Shp1 en phosphorylant la tyrosine 574 alors que la phosphorylation du résidu sérine 591 par la kinase Calpha inhibe l'activité de Shp1 <sup>138, 139</sup>. Shp1 peut avoir une localisation nucléaire ou cytoplasmique selon le type cellulaire et selon son niveau d'activité <sup>140</sup>. Shp1 serait localisée dans le cytoplasme à l'état basal, mais une séquence de localisation nucléaire située dans sa région carboxy-terminale lui permettrait d'atteindre le noyau lorsqu'activée <sup>141, 142, 143, 144</sup>. Comme d'autres PTP, Shp1 peut aussi être régulée par l'oxydation qui inhibe son activité catalytique <sup>145, 146</sup>. Le mécanisme de régulation de Shp1 le mieux connu demeure sans doute son auto-régulation par son domaine N-SH2. À l'état basal, ce domaine se replie sur le domaine enzymatique pour l'inhiber. Lorsqu'un substrat portant un résidu tyrosine phosphorylé se lie au domaine N-SH2, ce dernier libère le domaine catalytique et la protéine s'ouvre lui permettant ainsi d'interagir avec ces différents substrats (figure 8) <sup>147</sup>. Le domaine C-SH2, bien qu'il ne se lie pas directement au domaine catalytique, serait aussi impliqué dans la régulation de l'activité de Shp1. Ce

domaine servirait « d'antenne » liant les peptides phosphorylés ce qui entraînerait un changement de conformation permettant de libérer le domaine catalytique du domaine N-SH2 <sup>147</sup>.



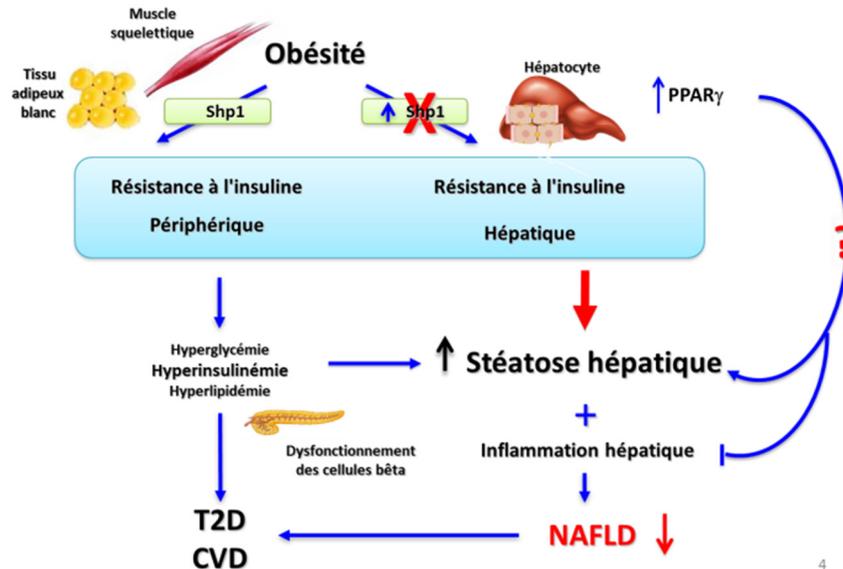
**Figure 1.8** : Conformation de la protéine Shp1 représentant les deux domaines SH2 ainsi que le domaine catalytique possédant une activité phosphatase. À l'état basal (a), le domaine N-SH2 se replie pour inhiber le domaine catalytique. L'association à un substrat (b) libère le domaine catalytique et active Shp1. Adapté de Xu et collaborateurs <sup>148</sup>.

La protéine Shp1 fut d'abord reconnue pour sa présence dans les cellules épithéliales et hématopoïétiques <sup>149</sup>, <sup>150</sup>. Elle est impliquée dans la régulation négative de différents processus cellulaires par la déphosphorylation de ses substrats. Shp1 inhibe entre autres la transduction intracellulaire des signaux déclenchés par la liaison à leurs récepteurs de certains facteurs de croissance, cytokines et stimuli immunitaires <sup>151</sup>, <sup>152</sup>, <sup>153</sup>, <sup>154</sup>. Shp1 bloque également la prolifération cellulaire <sup>143</sup>. Plusieurs études ont rapporté les propriétés suppressives de tumeurs de Shp1 et une association entre sa dérégulation et certains cancers <sup>155</sup>, <sup>156</sup>. Shp1 est aussi impliquée dans l'inhibition de la voie PI3K par la déphosphorylation de sa sous-unité p85 ce qui bloque l'activation d'AKT <sup>157</sup>, <sup>140</sup>, <sup>158</sup>.

Plus récemment, la présence de Shp1 a également été démontrée dans les tissus métaboliques tels le foie, le muscle squelettique et le tissu adipeux <sup>140</sup>. L'investigation du rôle de Shp1 dans ces tissus a montré que la protéine est un régulateur négatif de la sensibilité à l'insuline et de sa clairance <sup>140</sup>. Shp1 inhibe l'action de la *carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule-1* (CEACAM1), une protéine impliquée dans la clairance de l'insuline <sup>159</sup>. La déphosphorylation de CEACAM1 par Shp1 a un effet inhibiteur sur la molécule ce

qui diminue la clairance de l'insuline et contribue à l'hyperinsulinémie et à la détérioration des voies de signalisation métaboliques. Shp1 inhibe également la transduction du signal de l'insuline en déphosphorylant l'IR et la sous-unité p85 de PI3K ce qui soutient son action inhibitrice sur le complexe et réduit l'activation d'AKT et la translocation de GLUT4 à la membrane<sup>157, 160</sup>. En plus de son déplacement à la membrane, l'expression de GLUT4 est régulée négativement par Shp1<sup>160</sup>. De façon très intéressante, il a été démontré que l'obésité augmente l'expression de la protéine Shp1 dans les tissus métaboliques<sup>161</sup>. L'augmentation d'autres PTP, dont SHP-2 et PTP1B, a aussi été rapportée en lien avec le développement de la résistance à l'insuline<sup>34, 35, 162</sup>. Shp1 est donc impliquée dans la mise en place de la résistance à l'insuline en lien avec l'obésité<sup>161</sup>.

L'impact métabolique de la protéine Shp1 dans les hépatocytes a été évalué en utilisant des souris ayant un *knock out* (KO) spécifique dans les hépatocytes (*PTPN6<sup>H-KO</sup>*) soumises à une diète riche en gras<sup>161</sup>. Malgré l'apparition d'obésité suite à cette diète, l'inactivation de Shp1 protège les souris contre le développement de la résistance à l'insuline hépatique<sup>161</sup>. Conjointement à l'amélioration de l'homéostasie du glucose, les souris *PTPN6<sup>H-KO</sup>* présentent toutefois davantage de stéatose hépatique. Chez les souris soumises à une diète riche en gras de 16 semaines, l'absence de Shp1 hépatique résulte en un foie dont la masse est plus importante et qui est plus riche en triglycérides et en cholestérol. De façon surprenante, l'accumulation de lipides hépatiques n'est pas liée à une hausse de l'inflammation. Les souris *PTPN6<sup>H-KO</sup>* obèses présentent moins de dommages hépatocellulaires ainsi qu'une réduction des marqueurs inflammatoires hépatiques par rapport aux souris servant de contrôle<sup>135</sup>. Les souris *PTPN6<sup>H-KO</sup>* ont à la fois des niveaux diminués d'AST et d'ALT circulants et une réduction des niveaux d'IL-3, d'IL-6, de chimiokine *regulated on activation, normal T cell expressed and secreted* (RANTES) et de TNF- $\alpha$  hépatiques par rapport aux animaux servant de contrôle après 16 semaines de diète riche en gras. Ces résultats indiquent qu'il pourrait exister une dissociation entre inflammation et stéatose, deux conditions pourtant considérées comme liées l'une à l'autre dans le développement de la NASH (figure 9).



**Figure 1.9 :** Schéma démontrant l'hypothèse selon laquelle l'inflammation et la résistance à l'insuline peuvent ne pas aller de pair avec la stéatose hépatique. L'élévation de Shp1 dans l'obésité mène à la résistance périphérique à l'insuline. Toutefois, son invalidation dans le foie améliore l'accumulation de lipides hépatiques et diminue les marqueurs inflammatoires.

## Hypothèse et objectifs

Le lien entre la résistance à l'insuline et les désordres hépatiques observés précédemment chez les animaux *PTPN6<sup>H-KO</sup>*, invalidés pour la protéine Shp1 spécifiquement dans le foie, a particulièrement attiré l'attention de l'équipe du Dr Marette qui s'est par la suite intéressée aux cibles moléculaires de la protéine Shp1. Des analyses subséquentes ont démontré que, dans le foie des souris *PTPN6<sup>H-KO</sup>*, l'expression génique de *PPARγ* ainsi que son activité transcriptionnelle sont augmentées<sup>135</sup>. De plus, le phénotype de ces animaux, qui présentent une amélioration du profil inflammatoire associée à une hausse de la stéatose hépatique, concorde avec les effets attendus d'une activation hépatique de la protéine *PPARγ*. Ces résultats suggèrent l'existence d'une régulation de l'activité de *PPARγ* par Shp1. Comme mentionné précédemment, bien que plusieurs modifications post-traductionnelles de *PPARγ* aient été décrites et étudiées, peu de recherches se sont intéressées à la phosphorylation sur tyrosine de *PPARγ* jusqu'à maintenant. Nous avons donc émis l'hypothèse que Shp1, une protéine tyrosine phosphatase, puisse interagir directement avec *PPARγ* et qu'elle

régule négativement son activité en déphosphorylant ses résidus tyrosine. Nous avons donc évalué, en premier lieu, s'il existait bel et bien une relation directe entre Shp1 et PPAR $\gamma$  et si l'activité de cette dernière était dépendante de la phosphorylation de résidus tyrosine.

Les objectifs spécifiques de mon projet étaient donc de:

- 1- Confirmer l'existence d'une interaction directe entre Shp1 et PPAR $\gamma$
- 2- Déterminer les sites de liaison de Shp1 sur PPAR $\gamma$
- 3- Évaluer si Shp1 est impliquée dans la déphosphorylation des résidus tyrosine de PPAR $\gamma$
- 4- Identifier quels sont les résidus tyrosine impliqués
- 5- Établir l'impact de la phosphorylation de ces résidus tyrosine sur l'activité de PPAR $\gamma$

## **Chapitre 2: Shp-modulated tyrosine-phosphorylation regulates PPAR $\gamma$ activity in hepatocytes**

**Marie-Hélène Lavallée-Bourget<sup>1</sup>, Marie-Pier Forest<sup>1</sup>, Michael Schwab<sup>1</sup>, Kerstin Bellman<sup>1</sup>, Halim Maaroufi<sup>2</sup>, André Marette<sup>1</sup>**

1. Centre de recherche de l'Institut universitaire de cardiologie et de pneumologie de Québec – Université Laval, 2. Institut de biologie intégrative et des systèmes, Université Laval

## Résumé

Le *peroxisome proliferator activated receptor gamma* (PPAR $\gamma$ ) contrôle l'adipogénèse et plusieurs voies métaboliques. La protéine tyrosine phosphatase Shp1, inhibitrice de la cascade de l'insuline, régule négativement PPAR $\gamma$ . Nous avons démontré l'existence d'une interaction directe entre Shp1 et PPAR $\gamma$ . L'inactivation de Shp1 augmente la phosphorylation sur tyrosine de PPAR $\gamma$ . Nous avons identifié cinq nouveaux sites de phosphorylation sur tyrosine (Y) de PPAR $\gamma$ , incluant la Y355, localisée dans le domaine de liaison au ligand (LBD). La mutation de la Y355 en phénylalanine, non phosphorylable, diminue la liaison de PPAR $\gamma$  à Shp1 et réduit son activité même en présence de son agoniste la rosiglitazone. La mutation de la Y355 en acide aspartique, mimant la phosphorylation, tend à augmenter l'activité de PPAR $\gamma$ . Ces mutations n'affectent pas la localisation de PPAR $\gamma$ . La phosphorylation sur tyrosine localisée dans le LBD serait un nouveau mécanisme s'ajoutant aux voies de régulation fines de l'activité de PPAR $\gamma$  déjà connues.

## Abstract

Peroxisome proliferator activated receptor gamma (PPAR $\gamma$ ) is a key mediator of adipogenesis and metabolic pathways. It has been shown to be negatively regulated by Shp1, a protein tyrosine phosphatase implicated in the downregulation of insulin signaling. Here, we show a direct interaction between Shp1 and PPAR $\gamma$ . Knock down of Shp1 increases PPAR $\gamma$  phosphorylation. We identified five new tyrosine-phosphorylation sites in PPAR $\gamma$  including tyrosine 355, which is a central amino acid of the ligand-binding domain. Mutating tyrosine 355 to non-phosphorylatable phenylalanine decreases binding of PPAR $\gamma$  to Shp1 and reduces the activity of PPAR $\gamma$  even in the presence of the PPAR $\gamma$ -agonist rosiglitazone, whereas exchanging tyrosine 355 for the phosphomimetic aspartic acid tends to increase the activity of PPAR $\gamma$ . However, these mutations do not affect the nuclear localization of PPAR $\gamma$ . Our findings indicate that tyrosine phosphorylation of PPAR $\gamma$  in the ligand-binding domain adds a novel regulatory mechanism to the plethora of ways of fine-tuning PPAR $\gamma$ -activity.

# Introduction

The peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR $\gamma$ ) is known as the main regulator of adipogenesis<sup>1, 2, 3, 4</sup>. PPAR $\gamma$  has two isoforms, PPAR $\gamma$ 1 and 2, that differ by their tissue distribution and their length, PPAR $\gamma$ 2 having 28 amino acids more in its N-terminal part<sup>5, 6, 7</sup>. Highly expressed in adipocytes, PPAR $\gamma$  is also found in liver, skeletal muscle and macrophages and is implicated in the transport and storage of lipids, reduction of inflammation and improvement of glucose homeostasis<sup>6, 7, 8</sup>.

PPAR $\gamma$  activity can be regulated in different ways such as ligand binding, cofactor recruitment or post-translational modifications,<sup>9, 10, 11</sup>. PPAR $\gamma$  ligands include endogenous molecules like fatty acids or growth factors and exogenous molecules like the thiazolidinediones (TZD), antidiabetic drugs that are specific agonists of PPAR $\gamma$ <sup>9, 12, 13</sup>. Patients using TZD present with improved glucose metabolism, low density lipoprotein (LDL) distribution, reduction of inflammatory cytokines and accumulation and redistribution of fat in subcutaneous fat depots<sup>14, 15, 16, 17</sup>. Adipose tissue is rich in PPAR $\gamma$  and is the main site of action of TZDs, but it has been demonstrated that their therapeutic action also targets other tissues as shown in mice lacking PPAR $\gamma$  in adipocytes that still present with reduced circulating fatty acids with TZD treatment<sup>18</sup>. PPAR $\gamma$  is found in hepatocytes where its activation decreases gluconeogenesis and glycolysis, increases accumulation of fatty acids without promoting inflammation and improves insulin sensitivity<sup>19, 20</sup>. TZD, such as rosiglitazone and pioglitazone, are antidiabetic drugs but their use is now limited because of secondary effects<sup>21</sup>. More research efforts are now directed towards finding new selective PPAR $\gamma$  modulators (SPPARMs) that would possess PPAR $\gamma$ -mediated beneficial effects without causing undesirable side effects<sup>7, 22</sup>.

Recently, the protein tyrosine phosphatase Shp1 has been established as a modulator of PPAR $\gamma$  activity in the liver<sup>23</sup>. Shp1 negatively regulates several metabolic pathways including insulin signaling<sup>24</sup>. We have shown that Shp1 was increased in metabolic tissues such as liver, adipose tissue and muscle of obese mice<sup>25</sup>. Mice with a liver-specific Shp1-knock-out presented decreased insulin and plasma glucose levels, but developed increased liver steatosis. Surprisingly, these mice had reduced hepatocellular damages and less hepatic inflammation, suggesting an uncoupling between lipid accumulation and inflammation. Microarray analyses revealed that PPAR $\gamma$  expression in hepatocytes was increased in the absence of Shp1. Subsequent experiments indicated that PPAR $\gamma$  activity was regulated by Shp1 both *in vitro* and *in vivo*<sup>23</sup>. As mentioned earlier, PPAR $\gamma$  can be activated or inhibited by post-translational modifications such as serine phosphorylation, sumoylation, acetylation, ubiquitination and methylation<sup>26, 27, 28</sup>. However, the exact mechanism by which Shp1 regulates PPAR $\gamma$  activity remains elusive.

In this paper we investigate the link between Shp1 and PPAR $\gamma$  and the potential role of tyrosine phosphorylation on PPAR $\gamma$  activity. We confirm the existence of an interaction between Shp1 and PPAR $\gamma$  by co-immunoprecipitation and by molecular docking studies. We also report that PPAR $\gamma$  is tyrosine phosphorylated and that this phosphorylation can be modulated by Shp1. Mutagenesis experiments confirm the importance of tyrosine phosphorylation for the regulation of PPAR $\gamma$  activity and for binding with its ligand rosiglitazone. Finally, immunofluorescence studies show that the PPAR $\gamma$  mutants, lacking a tyrosine site, do not affect PPAR $\gamma$  cellular localization. Our results suggest a new way of regulating PPAR $\gamma$  activity that may eventually lead to the development of specific PPAR $\gamma$  modulators, which could be used for the treatment of obesity or diabetes with limited side effects.

## Results

### PPAR $\gamma$ interacts with Shp1

We have recently reported that Shp1 negatively regulates PPAR $\gamma$  activity<sup>23</sup>. Therefore, we wanted to investigate whether there was a direct interaction between the two proteins. To do so, *Flag-PPAR $\gamma$ 2* and *Shp1* constructs were co-transfected in HepG2 cells. Co-immunoprecipitation experiments showed that PPAR $\gamma$  can interact with both the Shp1 wildtype form (WT) and the Shp1 phosphatase inactive substrate-trapping mutant C453S (Fig. 1A, B). Shp1 shows some unspecific binding to either the Flag tag or the beads. However, the increased precipitation of Shp1 with PPAR $\gamma$  strongly suggests the interaction between the two proteins. Similar results were obtained in HEK293T cells (Fig. S1).

Docking analyses were then performed to predict the sites of interaction between Shp1 and PPAR $\gamma$ . The docking analysis identified a region of PPAR $\gamma$  (amino acids 346 to 357 with phosphorylated Y348 and Y355) which is predicted to bind to both the Shp1 catalytic domain and the C-SH2 domain (fig. 2A and 2B). Indeed, the docking of phosphorylated peptide 346-357 of PPAR $\gamma$  into the catalytic and the C-terminal SH2 domain of Shp1 indicates that their interaction can only occur if tyrosine 355 is phosphorylated. This result was strengthened by the superposition of PPAR $\gamma$  phosphorylated peptide 346-357 with tyrosine-phosphorylated peptide of tyrosine protein kinase JAK1 (PDB: 4GS0) or tyrosine-phosphorylated peptide of the natural killer group 2A (PDB: 2YU7) crystalized with Shp1 (Fig. 2A and 2B)<sup>29</sup>. The analysis of the PPAR $\gamma$  sequence showed an amino acid motif called immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif (ITIM) commonly found among Shp1 substrates surrounding phosphorylated tyrosine 355 (Fig. 2C)<sup>30</sup>. To confirm the importance of tyrosine 355 for the binding of PPAR $\gamma$  and Shp1, a co-immunoprecipitation experiment was performed in HepG2 cells. Cells were transfected with plasmids either expressing *Flag-PPAR $\gamma$ 2* wildtype or *Flag-PPAR $\gamma$ 2* Y355F where tyrosine has been mutated to the non-phosphorylatable phenylalanine and *Shp1* wildtype or

*Shp1 C453S*. Immunoblot analysis showed a reduction in Shp1 interaction with PPAR $\gamma$  when Tyr355 was mutated to phenylalanine (Fig. 2D, E). The binding was not completely abolished, meaning that other regions of the protein might be necessary for the link with Shp1. These results indicate that tyrosine 355 is important for the binding of PPAR $\gamma$  to Shp1.

### PPAR $\gamma$ is Shp1-dependently tyrosine phosphorylated

The direct interaction between Shp1 and PPAR $\gamma$ 2 suggests that PPAR $\gamma$  is a substrate of the protein-tyrosine phosphatase. Therefore, we next tested whether Shp1 could modify PPAR $\gamma$  tyrosine phosphorylation. HepG2 cells were co-transfected with plasmids expressing *Flag-PPAR $\gamma$ 2* and dominant-negative *Shp1 C453S*. Tyrosine phosphorylation of PPAR $\gamma$  was slightly increased when the dominant-negative *Shp1 C453S* construct was overexpressed (Fig. 3A). To confirm the effect of Shp1 on PPAR $\gamma$  tyrosine phosphorylation, cells were transfected with a siRNA targeting Shp1 and co-transfected with *Flag-PPAR $\gamma$ 2*. The siRNA treatment reduced Shp1 expression in the cells to about 50% leading to an increase in PPAR $\gamma$  phosphorylation of almost two fold (Fig. 3B). These data suggest that PPAR $\gamma$  is a direct substrate of Shp1.

### Identification of novel phospho-tyrosine sites in PPAR $\gamma$

To detect PPAR $\gamma$  tyrosine phosphorylation, HepG2 cells were treated with the general tyrosine phosphatase protein inhibitor bpV(HOpic). Flag-PPAR $\gamma$ 2 protein isolated from these cells showed an increase in molecular weight as demonstrated by its molecular shift (Fig. 4A). This retardation was caused by an important increase in tyrosine phosphorylation of the protein as shown by western blot using a phospho-tyrosine specific antibody. Similar results were obtained in HEK293T cells, primary hepatocytes and 3T3-L1 cells (Fig. S2).

To determine which tyrosine residues in PPAR $\gamma$  were phosphorylated after bpV(HOpic) treatment, samples from cells untreated and treated with bpV(HOpic) were analyzed by mass spectrometry. Among the 18 PPAR $\gamma$  tyrosine residues, five were found to be phosphorylated in these conditions (tyrosine 93, 95, 116, 348 and 355) (Fig. S3). Three of the residues (Y93, Y95 and Y116) are located in the ligand-independent transcriptional activating function domain (AF-1 domain) while two others (Y348 and Y355) are in the ligand-binding domain (LBD) (Fig. 4B).

### Mutation of tyrosine residues modulates PPAR $\gamma$ activity

The five identified tyrosine residues were targeted by site-directed mutagenesis on *Flag-PPAR $\gamma$ 2* plasmid to modify tyrosine into phenylalanine<sup>29</sup>. Because two tyrosine residues, Y93 and Y95, are close to each other a double mutant was made to investigate any additive effects of those two residues. Six mutants were thus created (Y93F, Y95F, Y93F/Y95F, Y116F, Y348F and Y355F) and tested in functional studies.

Each plasmid carrying a different mutant construct was first transfected separately in cells, treated with bpV(HOpic) and then immunoprecipitated. Analysis of each of the six mutants showed moderate effect on total PPAR $\gamma$ 2 tyrosine phosphorylation (Fig. 5A, B). Similar but not significant results were obtained in HEK293T cells (FigS4A). This could be explained by the fact that only one, or two, tyrosine residues out of 18, of which at least 5 might be phosphorylated, were mutated making the possible variations very hard to detect by western blot analysis. To investigate the effect of tyrosine phosphorylation of PPAR $\gamma$  on its activity, the same mutant constructs were used for luciferase assay. Each plasmid was co-transfected in HepG2 cells with a PPAR response element (PPRE)-luciferase reporter construct. Cells were treated during the last 16 hours with the PPAR $\gamma$  agonist rosiglitazone (25 nM) before harvesting to increase PPAR $\gamma$  activation. As expected, rosiglitazone treatment increased PPAR $\gamma$  activity by about three fold (Fig. 5C). The majority of the Y/F mutants decreased PPAR $\gamma$  activity but only the Y348F and the Y355F mutants reached the level of statistical significance. Both mutations also reduced basal PPAR $\gamma$  activity (Fig 5B). Similar results were observed in HEK293T cells (Fig. S4B). These data suggest that both Y348 and Y355 may play an important role in PPAR $\gamma$  activation by rosiglitazone.

The region of PPAR $\gamma$  bearing tyrosine residues 348 and 355 was then submitted to modeling analysis. The first model presents PPAR $\gamma$  agonist rosiglitazone interacting with PPAR $\gamma$  ligand binding domain (Fig. 5D). The model showed that tyrosine 348 is pointing toward the outside of the binding pocket. This orientation would not allow this tyrosine to interact directly with rosiglitazone. Tyrosine 355, on the other hand, is located right inside the binding pocket. Further analyses revealed that unphosphorylated tyrosine 355 is located 4.8 Å away from rosiglitazone. This atomic distance would be too far to allow hydrogen bonds between the two molecules<sup>31</sup>. However, phosphorylation of tyrosine 355 would allow to reduce the distance to only 2.8 Å, which would allow the binding of rosiglitazone to PPAR $\gamma$  through phosphorylated tyrosine 355.

To pursue the investigation of the role of tyrosine phosphorylation on PPAR $\gamma$  activity, a second site-directed mutagenesis was performed on *Flag-PPAR $\gamma$ 2* construct. Instead of modifying tyrosine into phenylalanine, tyrosine was changed to either aspartic acid or glutamic acid in order to mimic constitutive phosphorylation by introducing negatively charged residues<sup>29</sup>. Only the sites that showed significant reduction of PPAR $\gamma$  activity when mutated for phenylalanine (Y348F and Y355F) were tested. Four new mutants were created (Y348D, Y348E, Y355D and Y355E). The various mutated constructs were co-transfected in cells with PPRE-luciferase reporter construct and treated with rosiglitazone (25 nM) during the last 16 hours before harvesting. Mutations in the Y348 position were found to completely inhibit PPAR $\gamma$  activity (Fig. 5E). This may be explained by an important change in the protein conformation, probably caused by the breaking of the aromatic-aromatic interaction between Y348 and Y505. Unexpectedly, the Y355E mutation also decreased PPAR $\gamma$  activity to a

similar level as Y355F mutation both with and without rosiglitazone treatment as presented in figure 5B suggesting a perturbation of the rosiglitazone binding pocket. Interestingly, the Y355D mutation tended to increase PPAR $\gamma$  activity in the absence of rosiglitazone, but its activity could only marginally be increased by rosiglitazone treatment. This implies that the Y355D mutation interferes with rosiglitazone action, but activates PPAR $\gamma$  maybe by facilitating binding of a natural ligand. Indeed, aspartic acid has a shorter side chain than glutamic acid meaning that it is slightly more rigid within protein structures. This gives it a slightly stronger preference to be involved in protein active sites.

### Tyrosine 355 mutants do not affect PPAR $\gamma$ localization

Since PPAR $\gamma$  is active in the nucleus, immunofluorescence was performed to investigate whether the change in its activity when tyrosine 355 is mutated was due to a change in its localization. Cells were transfected with the various forms of *PPAR $\gamma$ 2* mutated at tyrosine 355 (WT, Y355F and Y355E) and treated with rosiglitazone to compare the activated and inactivated states of PPAR $\gamma$  protein. Immunocytochemistry revealed that PPAR $\gamma$  wildtype was mainly located in the nucleus (Fig. 6A). The nuclear/non-nuclear protein localization ratio did not show any change in PPAR $\gamma$  localization with rosiglitazone treatment or with any of the mutations. Taken together, these data demonstrate that the phosphorylation of tyrosine residues could increase PPAR $\gamma$  activity without affecting its localization within the cell.

## Discussion

We have previously shown that Shp1 negatively regulates PPAR $\gamma$  activity in the liver <sup>23</sup>, but the exact mechanism remained to be clarified. In this study, we suggest that Shp1 could interact directly with PPAR $\gamma$  to dephosphorylate it and reduce its activity.

Our co-immunoprecipitation experiments first confirm that these two proteins interact in a close environment. Molecular docking studies propose that the PPAR $\gamma$  ligand-binding domain (LBD) can bind to Shp1 protein. Shp1 possesses three different domains: a catalytic domain and two SH2 domains, an N- and a C-terminal, to bind to its different interaction partners or substrates. Two of these were predicted to specifically bind to PPAR $\gamma$ : the catalytic domain and the C-SH2 domain. Furthermore, the binding with the two domains would be dependent on the phosphorylation of PPAR $\gamma$  tyrosine 355. The amino acid sequence surrounding tyrosine 355 represents an immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif (ITIM) that is common to Shp1 substrates: (L/I/V)X<sub>1-2</sub>pYXX(L/I/V) <sup>30, 32</sup>. Shp1 can auto-regulate itself by conformational changes <sup>33, 34</sup>. The N-SH2 domain folds back on the catalytic domain to inhibit its activity. When Shp1 binds to one of its targets, through either the N or the C-SH2 domain, the N-SH2 domain liberates the catalytic domain, the protein unfolds and

produces its enzymatic activity on its substrate. The modeling of the dual interaction of phosphorylated tyrosine 355 of PPAR $\gamma$  with both the C-SH2 and the catalytic domains of Shp1 suggests that PPAR $\gamma$  could be a substrate of Shp1. Further investigations are needed to confirm the role of PPAR $\gamma$  as a target of Shp1. It would also be interesting to identify the kinases responsible for the phosphorylation of tyrosine 355.

Our work then explored the role of PPAR $\gamma$  tyrosine phosphorylation. Here we confirmed that PPAR $\gamma$  is phosphorylated on several tyrosine residues. Moreover, we showed that Shp1 plays a role in the regulation of PPAR $\gamma$  tyrosine phosphorylation; its invalidation increases tyrosine phosphorylation. Additionally, we demonstrated that mutation of some of the tyrosine residues modulated PPAR $\gamma$  activity.

Up to now, very little is known about tyrosine phosphorylation of PPAR $\gamma$ . Keshet et al. reported the role of two tyrosine residues located in the AF-1 domain in the regulation of PPAR $\gamma$  activity<sup>35</sup>. The tyrosine residues 78 and 102 were found to be phosphorylated by the non-receptor tyrosine kinase Abelson murine leukemia viral oncogene (c-Abl) to increase PPAR $\gamma$  stability and activity to promote adipogenesis. These two tyrosine residues were not among the five phosphorylated tyrosine residues identified by our mass spectrometry analysis. One explanation may be the different conditions that have been used in their experiment (overexpression of c-Abl) compared to ours (bpV(HOpic) treatment). Also, mass spectrometry detects highly concentrated peptides. Considering that phosphorylation on tyrosine is labile and our samples may have contained a mixture of different modification states, all the phosphorylated tyrosine residues may not have been detected in our analyses<sup>36</sup>. Keshet et al. also showed that the mutation of the tyrosine residues 78 and 102 into phenylalanine did not affect PPAR $\gamma$  activity in a luciferase assay. Like Keshet et al., we found by luciferase assay that the phenylalanine mutants localized in the AF-1 domain (tyrosine residues 93, 95 and 116) only have a small or no effect on PPAR $\gamma$  activity. However, Keshet et al. reported that tyrosine phosphorylation in the AF-1 domain does affect the activity of the protein because exchanging tyrosine 78 and 102 to the phosphomimetic glutamic acid significantly increased protein activity<sup>35</sup>. This is an avenue that we will test with the tyrosine residues 93, 95 and 116. We also saw that one of the mutants, Y116F, induces an important decrease in serine 112 phosphorylation (data not shown). Even if much is known about the function of serine 112 phosphorylation, its regulation by tyrosine 116 has never been reported<sup>26, 37, 38</sup>. Investigations are currently in progress to determine whether this finding constitute a novel mechanism of regulation of PPAR $\gamma$ .

In contrast to the other mutations, mutating Y348 and Y355 to phenylalanine decreased PPAR $\gamma$  activity significantly even in the presence of the agonist rosiglitazone. These two tyrosine residues are located close to the binding pocket of the LBD. While tyrosine 348 points away from the binding pocket, tyrosine 355 is located

within the binding pocket. When bound to PPAR $\gamma$ , agonists such as rosiglitazone are located in the “Y” shaped binding pocket formed by PPAR $\gamma$  alpha-helices number 3, 7 and 10<sup>39</sup>. This binding changes PPAR $\gamma$  conformation and locks the AF-2 domain in its active form to allow the binding of coactivators or the release of corepressors<sup>39, 40</sup>.

The nitrogen atom of the rosiglitazone ring makes hydrogen bonds with PPAR $\gamma$  specific amino acids. Some have been described as being essential for rosiglitazone binding: histidine 323, histidine 449 and tyrosine 473 (PPAR $\gamma$ 1)<sup>39, 41, 42</sup>. Moreover, a pharmacophore model derived from full PPAR $\gamma$  agonists revealed that tyrosine 327 of PPAR $\gamma$ 1 (corresponding to tyrosine 355 in PPAR $\gamma$ 2) can form hydrogen bonds with agonists to participate in the stabilization of the protein in its active conformation<sup>41</sup>. In our study, molecular interaction analysis between PPAR $\gamma$ 2 and rosiglitazone showed that phosphorylated tyrosine 355 is necessary for binding with rosiglitazone. The phosphorylation of this residue reduces the atomic distance between PPAR $\gamma$  and rosiglitazone to 2.8 Å which is close enough to allow the formation of hydrogen bonds<sup>31</sup>. The unphosphorylated form of tyrosine 355 remains too far, at 4.8 Å, from the substrate to permit binding. We show by luciferase assays that the phosphodead mutant Y355F, but also the phosphomimetic Y355D and Y355E mutants, decrease PPAR $\gamma$  activation by rosiglitazone.

Others have shown that single amino acid mutations of PPAR $\gamma$  can reduce or increase ligand specificity for PPAR $\gamma$  just by changing the position of the ligand in the docking pocket<sup>42</sup>. The Y355F as well as the Y355D and E mutations could induce a change in rosiglitazone position in the binding pocket and inhibit its agonist effect on PPAR $\gamma$ . Mutation of tyrosine 348 to aspartic acid or glutamic acid totally abolished PPAR $\gamma$  activity indicating a more important, general role of this residue for the PPAR $\gamma$  structure. More experiments will be necessary to confirm the exact role of these amino acids in the regulation of PPAR $\gamma$  activity.

A modification in the localization of the mutated PPAR $\gamma$  forms (Y355F and Y355D) does not explain the changes in the protein activity as confirmed by immunofluorescence. The three forms of the protein remain located in the nucleus where the protein can exert its transcription factor activity. In our experiments, the percentage of transfected cells was low, which may not have allowed the detection of small changes in the localization of the mutants. Such experiment may require stably transfected cells. It should also be investigated whether Shp1, which possesses a nuclear localization sequence in its C-terminal part, could colocalize with PPAR $\gamma$  in the nucleus<sup>43</sup>.

Interestingly, the phosphomimetic Y355D mutant tended to increase PPAR $\gamma$  activity, although to a smaller extent than rosiglitazone, a full agonist of PPAR $\gamma$ . Many studies are currently trying to identify new selective

PPAR $\gamma$  modulators (SPPARMs) that could benefit from only some selective PPAR $\gamma$  effects without causing undesirable ones <sup>7, 44</sup>. Some partial agonists of PPAR $\gamma$  have been demonstrated to present the beneficial effects of PPAR $\gamma$  activation without having the adverse effects of the full agonists <sup>45</sup>. Also, *PPAR $\gamma$  +/-* animals show improved insulin sensitivity without having higher body weight or higher free fatty acid levels than homozygous mice suggesting that partial activation of PPAR $\gamma$  can uncouple its effects on insulin sensitization and adipogenesis <sup>46</sup>. It would be interesting to look at the physiological effect of the Y355D on insulin sensitivity and lipid metabolism.

It has been shown that Shp1 is increased by obesity in metabolic tissues such as muscle, liver and adipose tissue and that it may play a role in the development of obesity-linked insulin resistance <sup>25</sup>. According to our previous studies with hepatocyte specific Shp1 knock out mice, the increased hepatic PPAR $\gamma$  activity improves the metabolic profile of the animals <sup>23</sup>. These high fat diet (HFD)-fed mice were protected from hepatic insulin resistance and presented reduced liver inflammation and hepatocellular damages even if they had augmented hepatic steatosis <sup>23</sup>. Our results suggest that phosphorylation of tyrosine 355, negatively regulated by Shp1, leads to an increase in PPAR $\gamma$  activity which could explain the beneficial effects in the Shp1 knock-out mice. As mentioned previously, hepatic activation of PPAR $\gamma$  has anti-inflammatory, insulin-sensitizing and pro-steatotic effects <sup>19</sup>. Activation of hepatic PPAR $\gamma$  results in increased IRS and AKT phosphorylation, which leads to improvement of insulin signaling <sup>47</sup>. Liver PPAR $\gamma$  reduces the amount of circulating glucose by increasing GLUT2 expression to augment hepatic glucose disposal and by reducing hepatic glucose production <sup>48, 49</sup>. Activated PPAR $\gamma$  in liver also decreases liver VLDL production and is associated with anti-inflammatory effects such as the reduction of TNF- $\alpha$  and IL-6 <sup>50, 51, 52</sup>. A reduction of PPAR $\gamma$  activity would lead to increased inflammation, hepatic insulin resistance and more circulating fatty acids. Accordingly, mutations in human PPAR $\gamma$  that decrease its activity are generally associated with lipodystrophy and insulin resistance <sup>4, 29, 53, 54</sup>. In an obesity context, an accumulation of Shp1 would lead to the dephosphorylation of PPAR $\gamma$  and to the reduction of its activity in metabolic tissues. Thus, the PPAR $\gamma$ -Shp1 interaction we highlighted may partly explain the development of insulin resistance induced by high fat diet.

Taken together, our work revealed a new mechanism of regulation of PPAR $\gamma$  activity. Very little is known about the functional consequences of tyrosine phosphorylation of PPAR $\gamma$  and to the best of our knowledge this is the first time that PPAR $\gamma$  and Shp1 are reported to interact directly. In this regard, we demonstrate that, among the 18 tyrosine residues of PPAR $\gamma$ , tyrosine 355 is an interesting target because its phosphorylation regulates PPAR $\gamma$  activity. It is important for binding to both rosiglitazone and Shp1, and it could be the residue by which Shp1 regulates PPAR $\gamma$  activity. It is still not known whether there is a competition between Shp1 and

rosiglitazone for the interaction with tyrosine 355. Could Shp1 be one of the corepressors of PPAR $\gamma$  that are released after rosiglitazone binding in the LBD? This avenue still remains to be explored. Also, more experiments have to be performed to explore the kinase implicated in tyrosine 355 phosphorylation and the physiological effects of the phosphorylation of tyrosine 355. These results could lead to the development of new drugs targeting PPAR $\gamma$  for the treatment of insulin resistance and diabetes.

## Experimental procedures

### DNA constructs

To create PPAR $\gamma$ 2 expression constructs, cDNA of mouse *PPAR $\gamma$ 2* was PCR-amplified and cloned into the *Bam*HI-*Eco*RI-sites of a pcDNA3 vector containing the sequence for an NH<sub>2</sub>-terminal fusion of a triple Flag-epitope or a *pcDNA3.1* vector containing the sequence for an NH<sub>2</sub>-terminal fusion of a triple Myc-epitope. Amino acid exchanges in PPAR $\gamma$ 2 were generated by site-directed mutagenesis (QuikChange, Agilent Technologies) of the respective codons in the *Flag-PPAR $\gamma$ 2* plasmid using primers listed in Table 1. Shp1-expression plasmids were made by PCR-amplification and cloning of the open reading frame of mouse *Shp1* or *Shp1 C453S* into *Hind*III-*Xho*I-sites of *pcDNA5/FRT/TO* (Invitrogen).

Table 2.1: PPAR $\gamma$ 2 mutagenesis primers

Mutation site	Foward sequence	Reverse sequence
Y93F	5'-CAATGGTTGCTGATTTAAATATGACCTGAAG -3'	5'-GTTACCAACGACTAAAATTTATACTGGACTTC -3'
Y95F	5'-GGTTGCTGATTACAAATTTGACCTGAAGCTCC -3'	5'-CCAACGACTAATGTTTAAACTGGACTTCGAGG -3'
Y93F/Y95F	5'-CAATGGTTGCTGATCTCAAACCTGACCTGAAGCTCC-3'	5'-GTTACCAACGACTAGAGTTTGAGCTGGACTTCGAGG-3'
Y116F	5'-CCTGCATCTCCACCGTACTTTTCTGAAAAGACCCAG -3'	5'-CTGGGTCTTTTCAGAAAAGTACGGTGGAGATGCAGG -3'
Y348F	5'-GTGACTCTGCTCAAATTTGGTGTCCATGAGATC -3'	5'-GATCTCATGGACACCAAATTTGAGCAGAGTCAC -3'
Y355F	5'-GGTGCCATGAGATAATTCACGATGCTGGCCTC -3'	5'-GAGGCCAGCATCGTGAATATTATCTCATGGACACC -3'
Y348D	5'-GAATGACCAAGTGACTCTTTTAAAGGATGGTGTCCATGAGATCAT-3'	5'-ATGATCTCATGGACACCATCCTTTTAAAGAGTCACTTGGTCATTC-3'
Y348E	5'-GAATGACCAAGTGACTCTTTTAAAGGAAGGTGTCCATGAGATCAT-3'	5'-ATGATCTCATGGACACCCTCCTTTTAAAGAGTCACTTGGTCATTC-3'
Y355D	5'-GTGTCCATGAGATCATCGATACGATGCTGGCCTCC-3'	5'-GGAGGCCAGCATCGTATCGATGATCTCATGGACAC-3'
Y355E	5'-GTGTCCATGAGATCATCGAGACGATGCTAGCCTCCCTGATGAATAA-3'	5'-TTATTTCATCAGGGAGGCTAGCATCGTCTCGATGATCTCATGGACAC-3'

### Cell culture and transfection

HEK293T cells or HEK293 cells expressing *Flag-Shp1 C453S* (Xu et al. 2014) were grown in DMEM high glucose medium (GIBCO) supplemented with 2 mM glutamine and with 10% (vol/vol) bovine growth serum (Thermo Scientific). HepG2 cells were grown in DMEM low glucose medium (GIBCO) supplemented with 10% (vol/vol) bovine growth serum (Thermo Scientific). Cells were cultured at 37°C in a humidified incubator with

5%(vol/vol) CO<sub>2</sub>. HEK293T cells were transfected using Polyethylenimine (PEI) <sup>55</sup>. HepG2 cells were transfected using jetPRIME (Polyplus-transfection, New York, USA) transfection reagent according to the manufacturer's instructions with cell confluence between 60 to 80%. The medium was changed four hours after transfection. HepG2 cells were transfected with siRNA targeting *Shp1* or an aleatory sequence (scrbl) using INTERFERin transfection reagent (Polyplus-transfection, New York, USA). Depending on the experiment, the day after the transfection, some cells were treated during the last 16 hours before harvesting with rosiglitazone (SynFine 010301) dissolved in DMSO (25 nM). Others were treated two days after transfection with bpV(HOPic) (203701Calbiochem) reconstituted in water at 10 μM (HepG2) or 20 μM (HEK293T) for 30 minutes before harvesting.

## **Immunoprecipitation and western blot**

Cells were homogenized in lysis buffer (20 mM Tris pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 10% glycerol, 1% NP-40, 1mM PMSF, 50 mM NaF, 2 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 80 mM β-glycero-phosphate, 5 mM NaPPi, 1x dilution of protease inhibitors (Sigma)) . Protein concentrations were determined with a BCA protein assay kit (Thermo Scientific Pierce, San Francisco CA, USA). For immunoprecipitation, lysates were incubated for two hours with Anti-Flag M2 affinity gel (Sigma) Flag-coated agarose beads. After washes with lysis buffer, beads were boiled in Laemmli buffer for 10 minutes. Immunoprecipitates and total lysates samples were run on 6.75% polyacrylamide gels. Proteins were transferred on nitrocellulose membrane and detected by immunoblotting with various antibodies: anti-Flag (F1804 Sigma-Aldrich), anti-Shp1 (Sc287 Santa Cruz Biotechnology, CA, USA), anti-phosphotyrosine PY20 (ab10321 Abcam), anti-phosphotyrosine 4G10 (05-321 Millipore, Germany), anti-eEF2 (2332s Cell Signaling Technology). HRP-conjugated secondary antibodies from mouse and rabbit were used from Jackson ImmunoResearch Laboratories (USA). Chemiluminescence agents (Millipore, Canada) were used to activate the reaction, which was detected by the EC3 Imaging System with Vision Works LS software (UVP, USA). Quantification of densitometry was made using ImageJ Image analysis software (U.S. National Institutes of Health, USA).

## **Mass spectrometry**

Samples incubated with Anti-Flag M2 affinity gel (Sigma) Flag-coated agarose beads were sent for mass spectrometry analysis. The on-beads digest and mass spectrometry experiments were performed by the Proteomics platform of the CHU de Quebec Research Center (Quebec, Canada). Proteins on beads were washed three times with 50 mM ammonium bicarbonate buffer and kept at -20°C until trypsin digestion. Proteins on beads were suspended in 25 μl of 50 mM ammonium bicarbonate and incubated with Trypsin (1 μg) overnight at 37°C. Trypsin reaction was stopped by acidification with 3% acetonitrile-1% TFA-0.5% acetic acid. Beads were removed by centrifugation, the peptides were purified from supernatant on stage tip (C18)

and vacuum dried before MS injection. Sample was solubilized into 10  $\mu$ l of 0.1% formic acid and 5  $\mu$ l were analyzed by mass spectrometry.

Peptide samples were separated by online reversed-phase (RP) nanoscale capillary liquid chromatography (nanoLC) and analyzed by electrospray mass spectrometry (ES MS/MS). Scaffold (version 4.0.1), (Proteome Software Inc., Portland, OR) was used to validate MS/MS based peptide and protein identifications.

## Luciferase assay

HepG2 or HEK293T cells were co-transfected with the analyzed construct (empty *Flag* vector or *Flag-PPAR $\gamma$ 2* plasmid or mutated *Flag-PPAR $\gamma$ 2* plasmids) and with a plasmid containing the promoter PPAR $\gamma$  response element (*pGL3-PPRE*), a kind gift of Dr. F. Picard (CRIUCPQ, Quebec, Canada), coupled with the luciferase gene. Cells were treated with rosiglitazone (25 nM) during the last 16 hours and then lysed. Lysates were plated in a 96-well plate. The plate reader injected 195  $\mu$ l of a buffer containing ATP and luciferin and the measure was taken 0.05 ms exactly after the injection. The measures were corrected for the amount of protein per well and by western blot for the transfection level (*Flag-PPAR $\gamma$ 2* and eEF2 quantification).

## Immunofluorescence

Cells were grown on glass coverslips coated with poly-l-lysine. At harvesting, they were fixed in 3.7% formaldehyde. Cells were incubated in primary antibody overnight at 4°C and in secondary antibody for one hour at room temperature (anti-rabbit 647 (A27040 Thermo Scientific), anti-mouse 488 (A-11001 Invitrogen)). Glass coverslips were mounted in glycine mounting medium to prepare microscopy slides. Images were taken with a 20x objective on Axio Observer Z1 (Zeiss, Jena, Germany).

## Modeling and docking

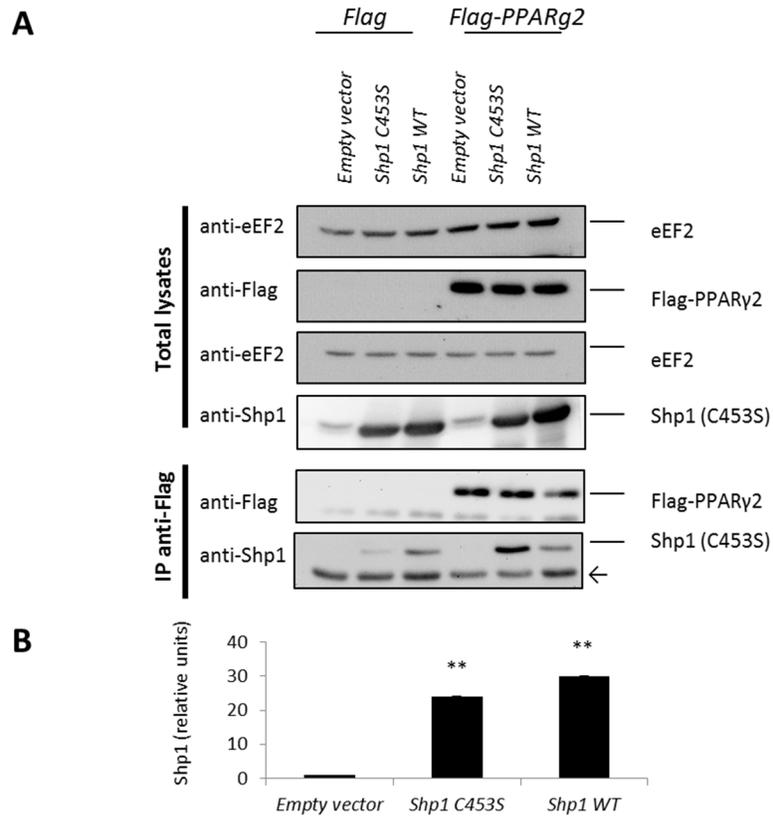
PPAR $\gamma$  and Shp1 3D mouse models have been constructed by homology from the human PPAR $\gamma$  and Shp1 structures (PDB id: 3E00\_D and 3PS5\_A, respectively) using Modeller software<sup>56, 57</sup>. *In silico* phosphorylation of tyrosine residues 348 and 355 of PPAR $\gamma$  peptide 346-357, was made by CHARMM-GUI software<sup>58</sup>. The phosphorylated PPAR $\gamma$  346-357 peptide docking into Shp1 C-SH2 and catalytic domains were realized and refined by PatchDock and FireDock softwares<sup>59, 60</sup>. Images were produced with the software PyMOL (<http://www.pymol.org>).

## Statistics

Student's t test and one way ANOVA with post-hoc Dunnett's test comparing samples to the WT control were used to determine statistical significance using Graph Pad Prism 5 software (California, USA). P values were

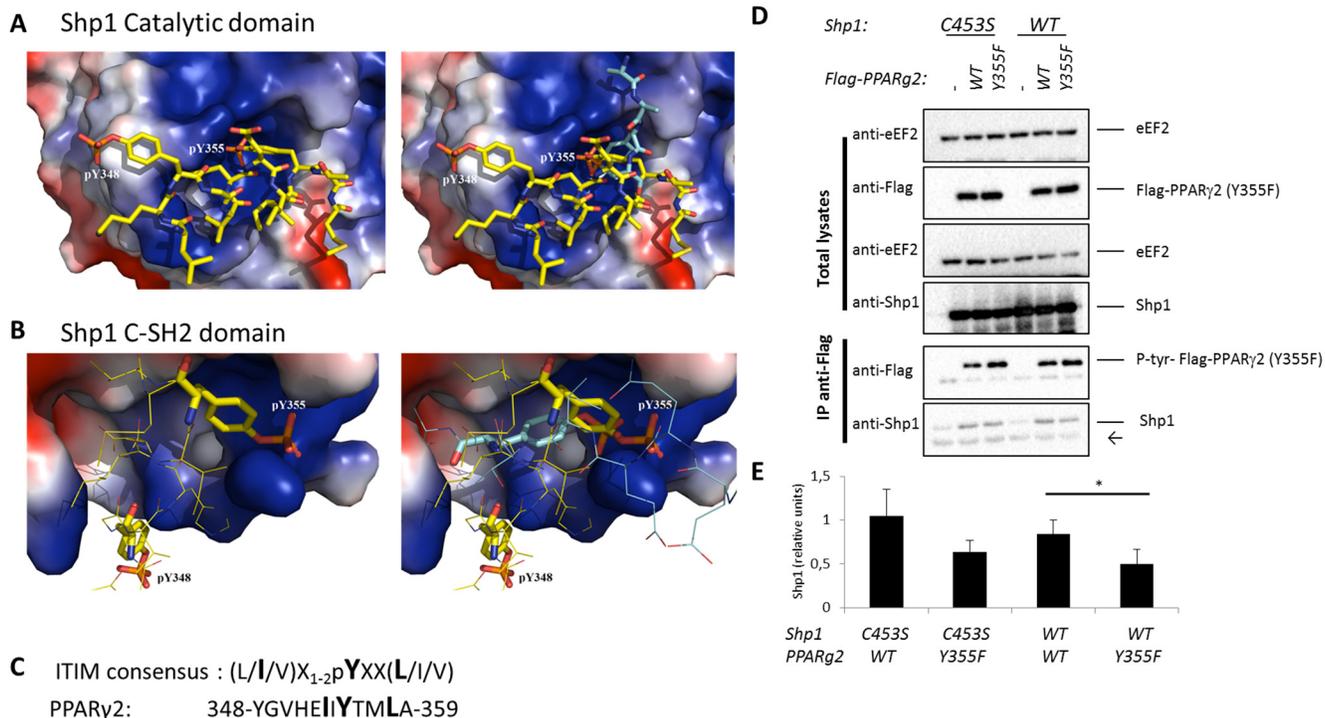
considered significant if less than 0.05. The graphs represent the mean of the values of two to four experiments. Error bars indicate the standard error of the mean (SEM).

# Figures



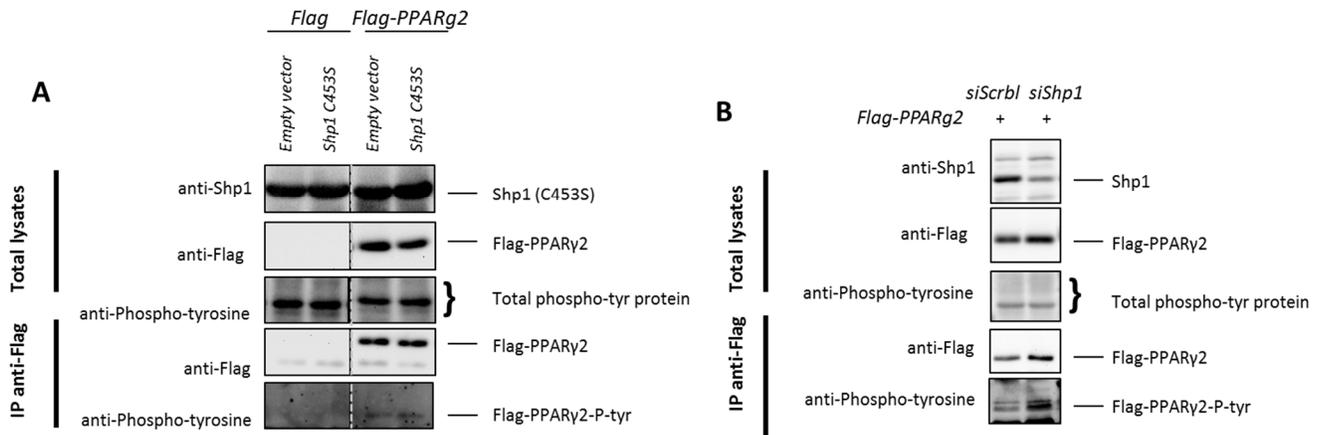
**Fig. 2.1.**

PPAR $\gamma$  interacts with Shp1. (A) HepG2 cells were transfected with the indicated plasmids and analyzed by immunoblotting after immunoprecipitation using Flag-specific antibodies. ← Detection of the heavy chain of immunoglobulin gamma (50KDa) by the secondary antibody. (B) Quantification of co-precipitated Shp1 using immunoprecipitated Flag-PPAR $\gamma$ 2 as loading control (n=3) (\*\*p  $\leq$  0.01).



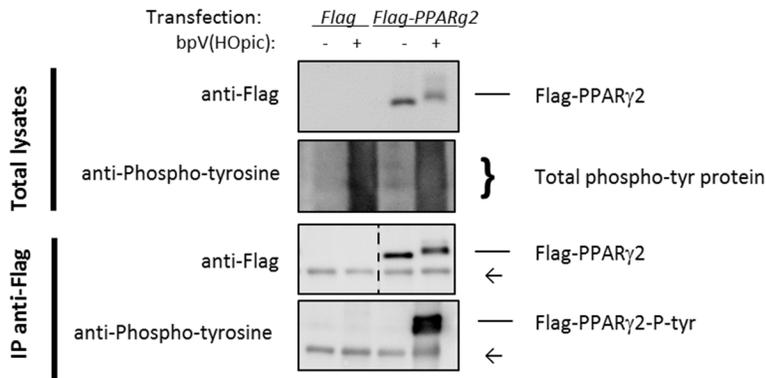
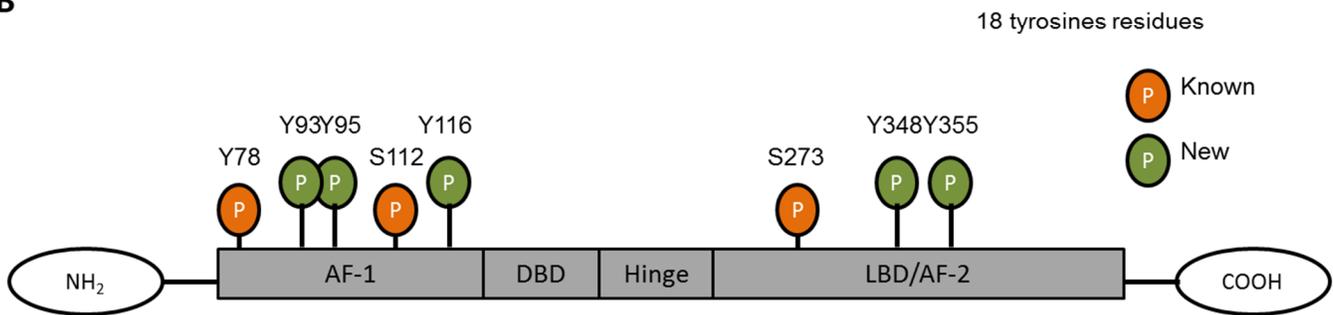
**Fig. 2.2.**

Tyrosine 355 of PPAR $\gamma$  is important for the interaction with Shp1. (A) Left image represents 3D electrostatic surface potential (negative and positive charges are shown in red and blue, respectively) of Shp1 catalytic domain with docked tyrosine phosphorylated PPAR $\gamma$  peptide 346-357 (yellow). The right image shows the superposition of peptide 346-357 (yellow) and a tyrosine-phosphorylated peptide from tyrosine protein kinase JAK1 (cyan, PDB: 4GS0). (B) Left image represents Shp1 C-terminal SH2 domain with docked PPAR $\gamma$  peptide 346-357 (yellow). The right image shows the superposition of this peptide (yellow) and a tyrosine-phosphorylated peptide from natural killer group 2A (blue, PDB: 2YU7). Peptides are represented by lines and phosphorylated tyrosine by sticks for clarity. (C) ITIM consensus sequence of Shp1 substrates aligned with PPAR $\gamma$ 2 sequence from amino acid 348 to 359. (D) HepG2 cells were co-transfected with the indicated plasmids. Lysates were immunoprecipitated with Flag-antibody coated beads and analyzed by western blot.  $\leftarrow$  Detection of the heavy chain of immunoglobulin gamma (50KDa) by the secondary antibody. (E) Quantification of co-precipitated Shp1 using immunoprecipitated Flag-PPAR $\gamma$ 2 as loading control (n=5) (\*p < 0.05).

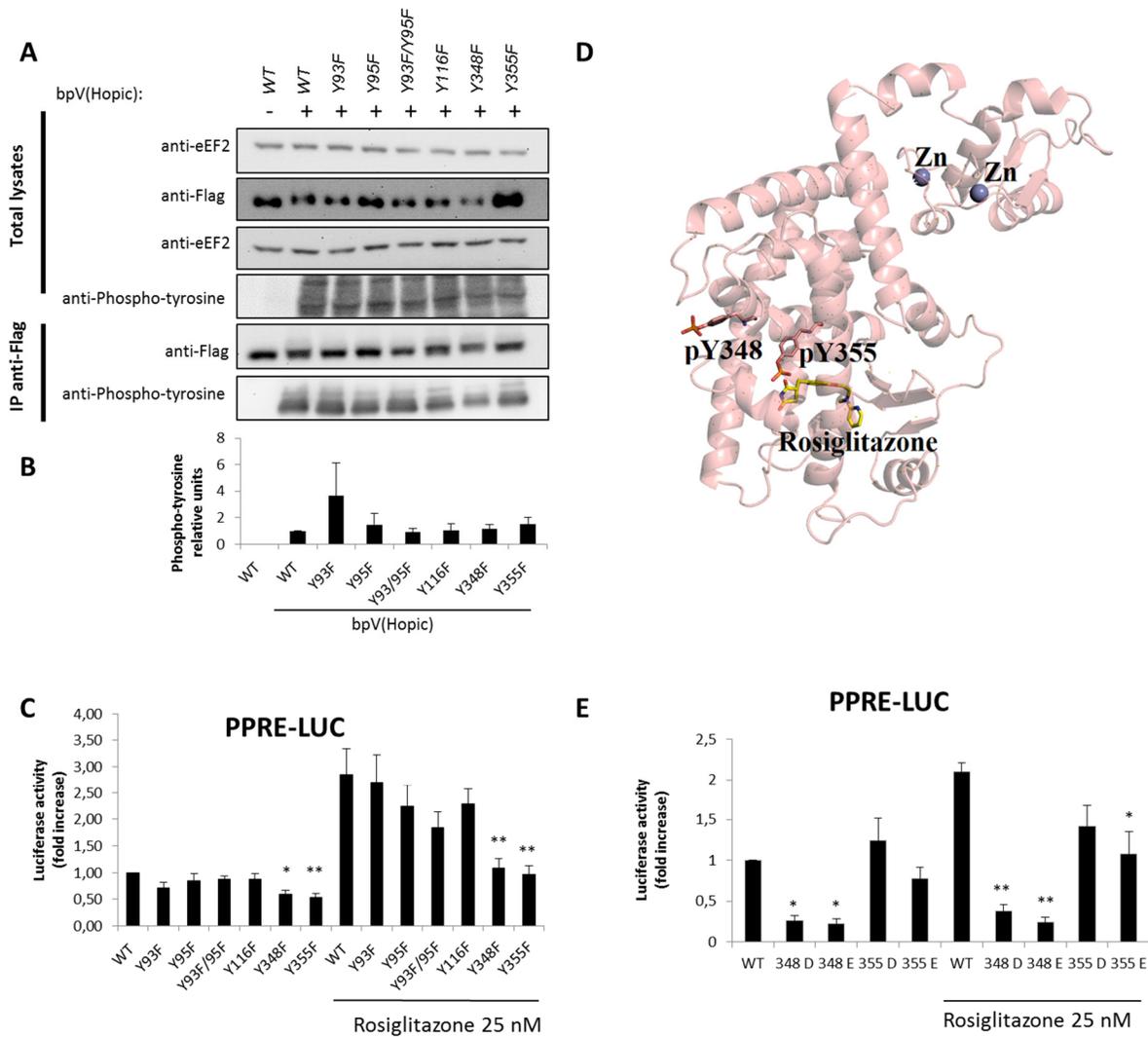


**Fig. 2.3.**

PPAR $\gamma$  is Shp1-dependently tyrosine-phosphorylated. (A) Cells were co-transfected with a construct encoding for a dominant-negative form of *Shp1* (C453S) or the corresponding empty vector (*pcDNA5*) and either *Flag* empty vector or *Flag-PPAR $\gamma$ 2* plasmid. Lysates were immunoprecipitated with anti-Flag beads and analyzed by western blotting. Dotted lines indicate non-contiguous lanes of the same gel. Data are representative of three independent experiments. (B) Cells were transfected with control siRNA or siRNA targeting *Shp1* and with a plasmid coding for *Flag-PPAR $\gamma$ 2* 48 hours later. Lysates were immunoprecipitated with anti-Flag beads and analyzed by western blot. Data are representative of two independent experiments.

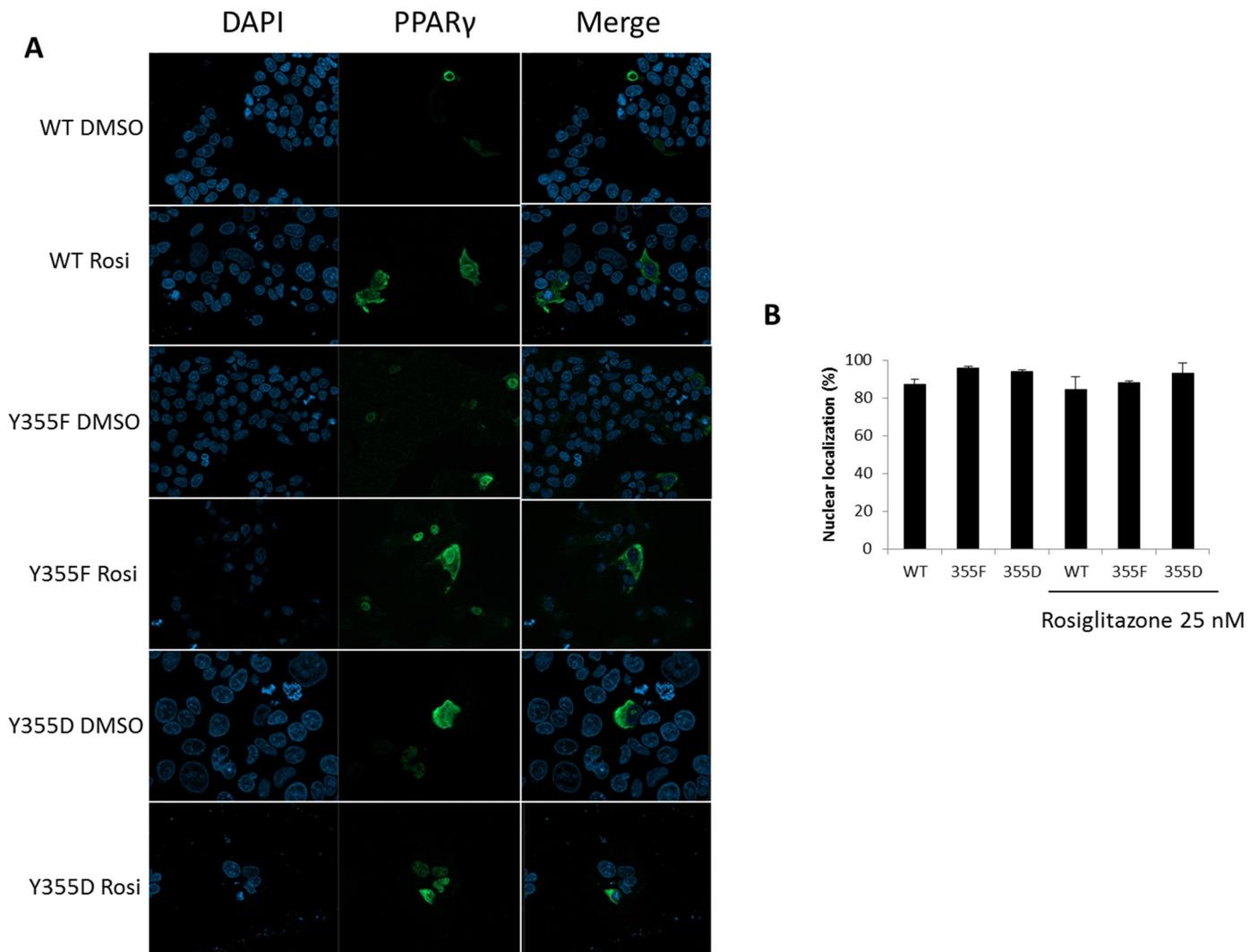
**A****B****Fig. 2.4.**

Identification of novel phosphor-tyrosine sites. (A) HepG2 cells transfected with an empty *Flag*-vector or a *Flag-PPAR $\gamma$ 2* plasmid were treated with bpV(HOpic) (10  $\mu$ M) during 30 minutes. Lysates were immunoprecipitated with anti-Flag beads and analyzed by immunoblot. Dotted lines indicate non-contiguous lanes of the same gel.  $\leftarrow$  Detection of the heavy chain of immunoglobulin gamma (50KDa) by the secondary antibody. (B) PPAR $\gamma$ 2 linear structure. **Y**: tyrosine, **S**: serine, **P**: phosphorylation, **AF-1**: ligand-independent activation function 1, **DBD**: DNA binding domain, **LBD**: ligand-binding domain, **AF-2**: ligand-dependent activation function 2.



**Fig. 2.5.**

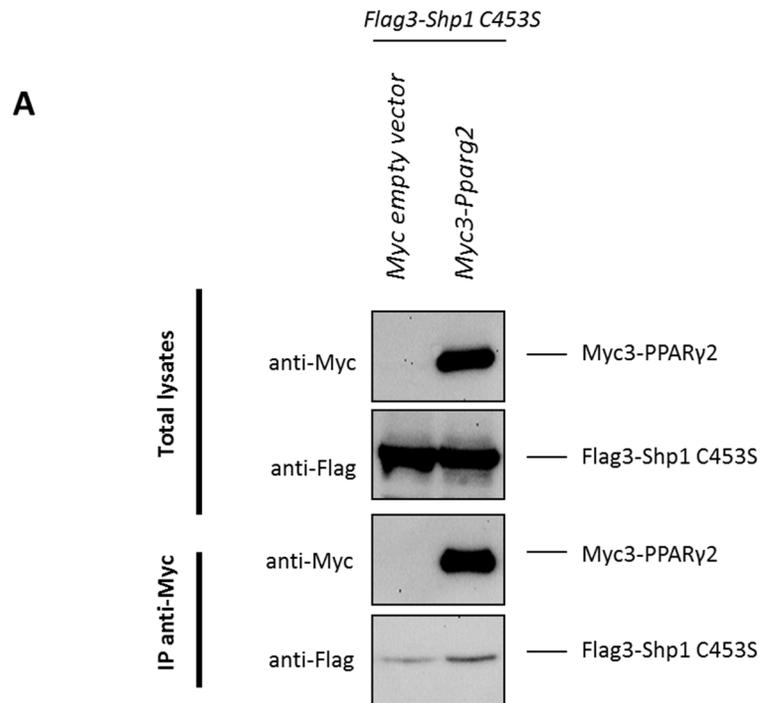
Y348 and Y355 mutations affect PPAR $\gamma$  activity. (A). HepG2 cells were transfected either with plasmids coding for wild type form or mutated form of *Flag-PPAR $\gamma$ 2*. Cells were treated with bpV(Hopic) (10  $\mu$ M) during 30 minutes before harvesting. Lysates were immunoprecipitated with anti-Flag beads and analyzed by western blot. (B) Quantification of PPAR $\gamma$ 2 tyrosine phosphorylation using immunoprecipitated Flag- PPAR $\gamma$ 2 as loading control. (C) Luciferase assay in HepG2 cells in which the indicated plasmids were co-transfected with PPRE-luciferase reporter construct. Cells were treated with rosiglitazone (25 nM) during the last 16 hours before harvesting (where indicated) (n=4) (\* p < 0.05, \*\* p < 0.01). (D) 3D structure of mouse PPAR $\gamma$  with phosphorylated tyrosine residues 348 and 355. Rosiglitazone (yellow) interacts with phosphorylated Y355 (2.8 Å). (E) Luciferase assay in HepG2 in which the indicated plasmids were co-transfected with PPRE-luciferase reporter construct. Cells were treated with rosiglitazone (25 nM) during the last 16 hours before harvesting (where indicated) (n=4) (\* p < 0.05, \*\* p < 0.01).



**Fig. 2.6.**

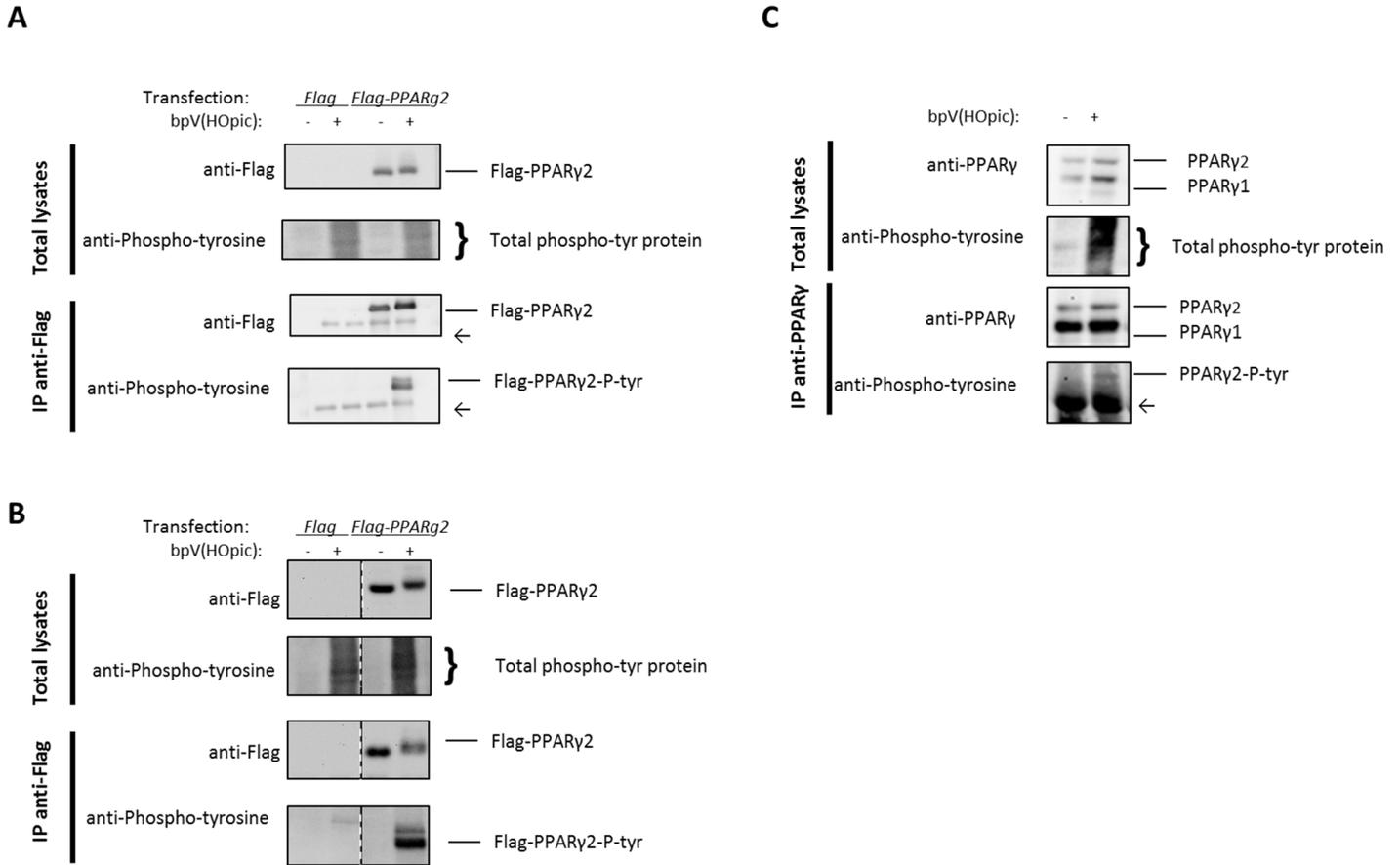
Y355 mutations do not change PPAR $\gamma$  localization. (A) Immunofluorescence assay in HepG2 cells transfected with either wild type, Y355F or Y355D *Flag-PPAR $\gamma$ 2* constructs. Cells were treated with rosiglitazone (25 nM) during the last 16 hours before fixation (where indicated). Exogenously expressed forms of *Flag-PPAR $\gamma$ 2* were detected with a Flag-specific antibody. (B) Quantification of the nuclear localization of PPAR $\gamma$  (%). 100-200 cells were counted per condition (n=2).

## Supplemental figures



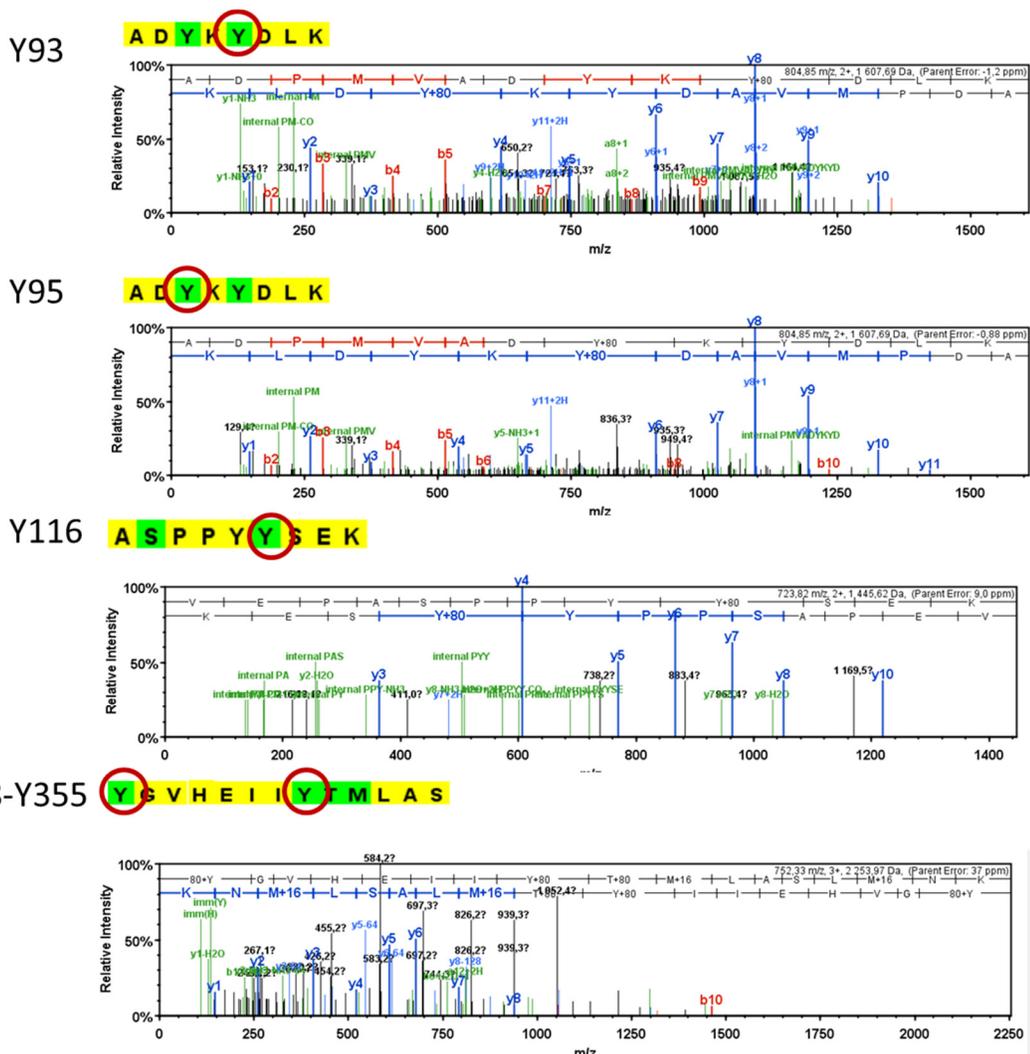
### Supp. 2.1.

PPAR $\gamma$  interacts with Shp1. (A) HEK 293 cells expressing *Flag-Shp1-C453S* were transfected with *Myc* empty vector or *Myc-PPAR $\gamma$ 2* plasmid. Lysates were analyzed by immunoblot after Myc co-immunoprecipitation.



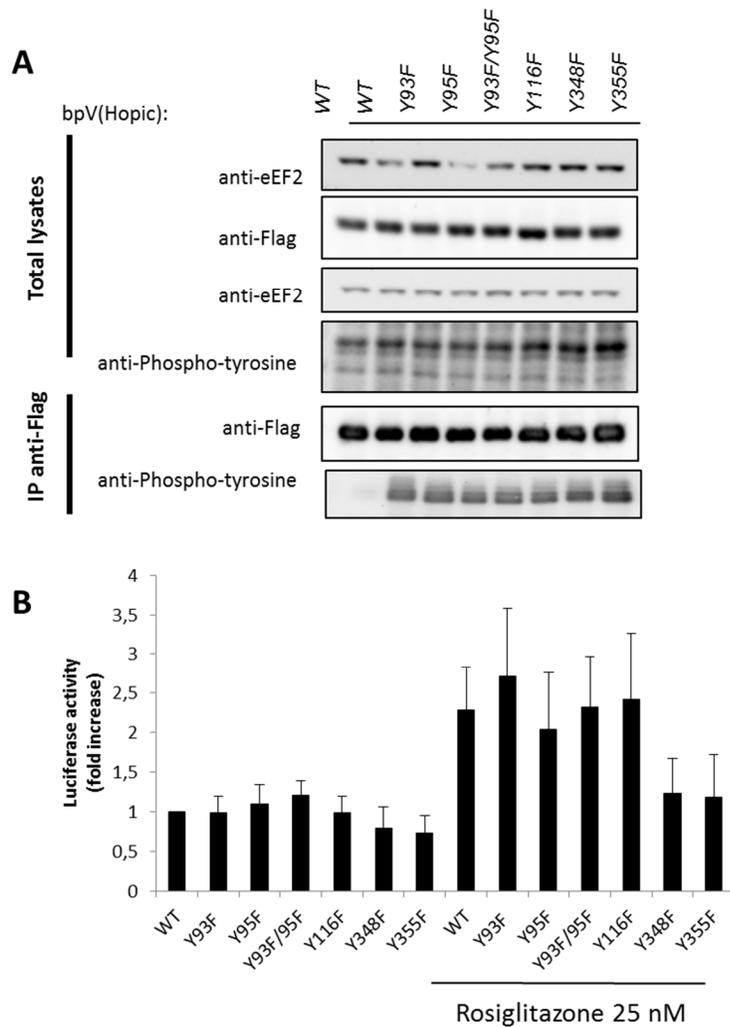
## Supp. 2.2.

PPAR $\gamma$  can be tyrosine phosphorylated. (A) Transfected HEK293T cells were treated with bpV(HOpic) (20  $\mu$ M) for 30 minutes. The lysates were co-immunoprecipitated with anti-Flag beads and analyzed by immunoblot. ← Detection of the heavy chain of immunoglobulin gamma (50KDa) by the secondary antibody. (B) Transfected primary hepatocytes were treated with bpV(HOpic) (10  $\mu$ M) during 30 minutes. The lysates were co-immunoprecipitated with anti-Flag beads and analyzed by immunoblot. Dotted lines indicate non-contiguous lanes of the same gel. (C) 3T3-L1 cells were treated with bpV(HOpic) (20  $\mu$ M) during 30 minutes. An immunoprecipitation has been performed to precipitate endogenous PPAR $\gamma$ .



### Supp. 2.3.

Identification of phosphorylated tyrosine residues of PPAR $\gamma$  by mass spectrometry. (A) Five phospho-tyrosine residues were identified in PPAR $\gamma$ 2 by MS/MS after HepG2 or HEK293T cells have been transfected with *Flag-PPAR $\gamma$ 2* and treated with bpV(HOpic) (10  $\mu$ M) for 30 minutes. MS/MS spectra of PPAR $\gamma$ 2 protein bearing one or two phosphorylated tyrosine residues.



## Supp. 2.4.

Y348 and Y355 mutations tend to affect PPAR $\gamma$  activity. (A). HEK293T cells were transfected either with plasmids coding for wild type form or mutated form of *Flag-PPAR $\gamma$ 2*. Cells were treated with bpV(HOpic) (20  $\mu$ M) during 30 minutes before harvesting. (B) Luciferase assay in HEK293T in which the indicated plasmids were co-transfected with PPRE-luciferase reporter construct. Cells were treated with rosiglitazone (25 nM) during the last 16 hours before harvesting (where indicated) (n=4).

# Bibliography

1. Issemann I, Green S. Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators. *Nature*. 1990;347(6294):645-650.
2. Wang YX, Lee CH, Tjep S, et al. Peroxisome-proliferator-activated receptor delta activates fat metabolism to prevent obesity. *Cell*. 2003;113(2):159-170.
3. Tontonoz P, Hu E, Spiegelman BM. Stimulation of adipogenesis in fibroblasts by PPAR gamma 2, a lipid-activated transcription factor. *Cell*. 1994;79(7):1147-1156.
4. Hegele RA, Cao H, Frankowski C, Mathews ST, Leff T. PPARG F388L, a transactivation-deficient mutant, in familial partial lipodystrophy. *Diabetes*. 2002;51(12):3586-3590.
5. Elbrecht A, Chen Y, Cullinan CA, et al. Molecular cloning, expression and characterization of human peroxisome proliferator activated receptors gamma 1 and gamma 2. *Biochem Biophys Res Commun*. 1996;224(2):431-437.
6. Moran-Salvador E, Titos E, Rius B, et al. Cell-specific PPARgamma deficiency establishes anti-inflammatory and anti-fibrogenic properties for this nuclear receptor in non-parenchymal liver cells. *J Hepatol*. 2013;59(5):1045-1053.
7. Choi SS, Park J, Choi JH. Revisiting PPARgamma as a target for the treatment of metabolic disorders. *BMB Rep*. 2014;47(11):599-608.
8. Hevener AL, He W, Barak Y, et al. Muscle-specific Pparg deletion causes insulin resistance. *Nat Med*. 2003;9(12):1491-1497.
9. Dutchak PA, Katafuchi T, Bookout AL, et al. Fibroblast growth factor-21 regulates PPARgamma activity and the antidiabetic actions of thiazolidinediones. *Cell*. 2012;148(3):556-567.
10. Banks AS, McAllister FE, Camporez JP, et al. An ERK/Cdk5 axis controls the diabetogenic actions of PPARgamma. *Nature*. 2015;517(7534):391-395.
11. Choi JH, Banks AS, Kamenecka TM, et al. Antidiabetic actions of a non-agonist PPARgamma ligand blocking Cdk5-mediated phosphorylation. *Nature*. 2011;477(7365):477-481.
12. Forman BM, Tontonoz P, Chen J, Brun RP, Spiegelman BM, Evans RM. 15-Deoxy-delta 12, 14-prostaglandin J2 is a ligand for the adipocyte determination factor PPAR gamma. *Cell*. 1995;83(5):803-812.
13. Evans RM, Barish GD, Wang YX. PPARs and the complex journey to obesity. *Nat Med*. 2004;10(4):355-361.
14. Kuzuya T, Iwamoto Y, Kosaka K, et al. A pilot clinical trial of a new oral hypoglycemic agent, CS-045, in patients with non-insulin dependent diabetes mellitus. *Diabetes Res Clin Pract*. 1991;11(3):147-153.
15. Tack CJ, Smits P, Demacker PN, Stalenhoef AF. Troglitazone decreases the proportion of small, dense LDL and increases the resistance of LDL to oxidation in obese subjects. *Diabetes Care*. 1998;21(5):796-799.
16. Jiang C, Ting AT, Seed B. PPAR-gamma agonists inhibit production of monocyte inflammatory cytokines. *Nature*. 1998;391(6662):82-86.
17. Kelly IE, Han TS, Walsh K, Lean ME. Effects of a thiazolidinedione compound on body fat and fat distribution of patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care*. 1999;22(2):288-293.
18. Chao L, Marcus-Samuels B, Mason MM, et al. Adipose tissue is required for the antidiabetic, but not for the hypolipidemic, effect of thiazolidinediones. *J Clin Invest*. 2000;106(10):1221-1228.
19. Gavrilova O, Haluzik M, Matsusue K, et al. Liver peroxisome proliferator-activated receptor gamma contributes to hepatic steatosis, triglyceride clearance, and regulation of body fat mass. *J Biol Chem*. 2003;278(36):34268-34276.
20. Gastaldelli A, Miyazaki Y, Mahankali A, et al. The effect of pioglitazone on the liver: role of adiponectin. *Diabetes Care*. 2006;29(10):2275-2281.

21. Tahrani AA, Barnett AH, Bailey CJ. Pharmacology and therapeutic implications of current drugs for type 2 diabetes mellitus. *Nat Rev Endocrinol*. 2016.
22. Liu C, Feng T, Zhu N, et al. Identification of a novel selective agonist of PPARgamma with no promotion of adipogenesis and less inhibition of osteoblastogenesis. *Sci Rep*. 2015;5:9530.
23. Xu E, Forest MP, Schwab M, et al. Hepatocyte-specific Ptpn6 deletion promotes hepatic lipid accretion, but reduces NAFLD in diet-induced obesity: potential role of PPARgamma. *Hepatology*. 2014;59(5):1803-1815.
24. Dubois MJ, Bergeron S, Kim HJ, et al. The SHP-1 protein tyrosine phosphatase negatively modulates glucose homeostasis. *Nat Med*. Vol 12. United States2006:549-556.
25. Xu E, Charbonneau A, Rolland Y, et al. Hepatocyte-specific Ptpn6 deletion protects from obesity-linked hepatic insulin resistance. *Diabetes*. Vol 61. United States2012:1949-1958.
26. Hu E, Kim JB, Sarraf P, Spiegelman BM. Inhibition of adipogenesis through MAP kinase-mediated phosphorylation of PPARgamma. *Science*. 1996;274(5295):2100-2103.
27. Yamashita D, Yamaguchi T, Shimizu M, Nakata N, Hirose F, Osumi T. The transactivating function of peroxisome proliferator-activated receptor gamma is negatively regulated by SUMO conjugation in the amino-terminal domain. *Genes Cells*. 2004;9(11):1017-1029.
28. Hauser S, Adelmant G, Sarraf P, Wright HM, Mueller E, Spiegelman BM. Degradation of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma is linked to ligand-dependent activation. *J Biol Chem*. 2000;275(24):18527-18533.
29. Deeb SS, Fajas L, Nemoto M, et al. A Pro12Ala substitution in PPARgamma2 associated with decreased receptor activity, lower body mass index and improved insulin sensitivity. *Nat Genet*. 1998;20(3):284-287.
30. Yang J, Cheng Z, Niu T, Liang X, Zhao ZJ, Zhou GW. Structural basis for substrate specificity of protein-tyrosine phosphatase SHP-1. *J Biol Chem*. 2000;275(6):4066-4071.
31. Netzel J, van Smaalen S. Topological properties of hydrogen bonds and covalent bonds from charge densities obtained by the maximum entropy method (MEM). *Acta Crystallogr B*. 2009;65(Pt 5):624-638.
32. Beebe KD, Wang P, Arabaci G, Pei D. Determination of the binding specificity of the SH2 domains of protein tyrosine phosphatase SHP-1 through the screening of a combinatorial phosphotyrosyl peptide library. *Biochemistry*. 2000;39(43):13251-13260.
33. Townley R, Shen SH, Banville D, Ramachandran C. Inhibition of the activity of protein tyrosine phosphate 1C by its SH2 domains. *Biochemistry*. 1993;32(49):13414-13418.
34. Pei D, Lorenz U, Klingmuller U, Neel BG, Walsh CT. Intramolecular regulation of protein tyrosine phosphatase SH-PTP1: a new function for Src homology 2 domains. *Biochemistry*. 1994;33(51):15483-15493.
35. Keshet R, Bryansker Kraitshtein Z, Shanzer M, Adler J, Reuven N, Shaul Y. c-Abl tyrosine kinase promotes adipocyte differentiation by targeting PPAR-gamma 2. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111(46):16365-16370.
36. Farley AR, Link AJ. Identification and quantification of protein posttranslational modifications. *Methods Enzymol*. 2009;463:725-763.
37. Compe E, Drane P, Laurent C, et al. Dysregulation of the peroxisome proliferator-activated receptor target genes by XPD mutations. *Mol Cell Biol*. 2005;25(14):6065-6076.
38. Iankova I, Petersen RK, Annicotte JS, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma recruits the positive transcription elongation factor b complex to activate transcription and promote adipogenesis. *Mol Endocrinol*. 2006;20(7):1494-1505.
39. Nolte RT, Wisely GB, Westin S, et al. Ligand binding and co-activator assembly of the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma. *Nature*. 1998;395(6698):137-143.
40. Iwata Y, Miyamoto S, Takamura M, Yanagisawa H, Kasuya A. Interaction between peroxisome proliferator-activated receptor gamma and its agonists: docking study of oximes having 5-benzyl-2,4-thiazolidinedione. *J Mol Graph Model*. 2001;19(6):536-542, 598-600.

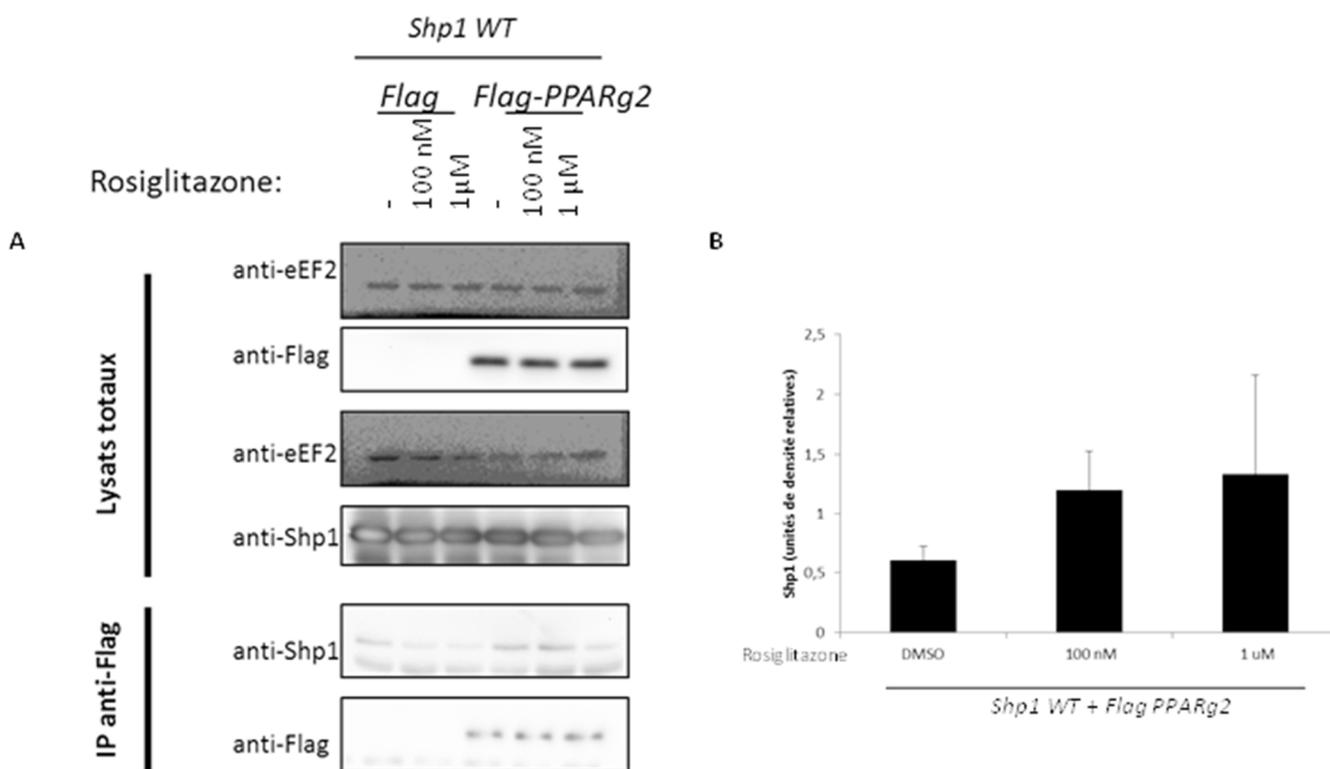
41. Tsakovska I, Al Sharif M, Alov P, et al. Molecular modelling study of the PPARgamma receptor in relation to the mode of action/adverse outcome pathway framework for liver steatosis. *Int J Mol Sci.* 2014;15(5):7651-7666.
42. Xu HE, Lambert MH, Montana VG, et al. Structural determinants of ligand binding selectivity between the peroxisome proliferator-activated receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98(24):13919-13924.
43. Craggs G, Kellie S. A functional nuclear localization sequence in the C-terminal domain of SHP-1. *J Biol Chem.* 2001;276(26):23719-23725.
44. Ahmadian M, Suh JM, Hah N, et al. PPARgamma signaling and metabolism: the good, the bad and the future. *Nat Med.* 2013;19(5):557-566.
45. Rocchi S, Picard F, Vamecq J, et al. A unique PPARgamma ligand with potent insulin-sensitizing yet weak adipogenic activity. *Mol Cell.* 2001;8(4):737-747.
46. Miles PD, Barak Y, He W, Evans RM, Olefsky JM. Improved insulin-sensitivity in mice heterozygous for PPAR-gamma deficiency. *J Clin Invest.* 2000;105(3):287-292.
47. Carpentier A, Taghibiglou C, Leung N, et al. Ameliorated hepatic insulin resistance is associated with normalization of microsomal triglyceride transfer protein expression and reduction in very low density lipoprotein assembly and secretion in the fructose-fed hamster. *J Biol Chem.* 2002;277(32):28795-28802.
48. Kim HI, Ahn YH. Role of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma in the glucose-sensing apparatus of liver and beta-cells. *Diabetes.* 2004;53 Suppl 1:S60-65.
49. Natali A, Ferrannini E. Effects of metformin and thiazolidinediones on suppression of hepatic glucose production and stimulation of glucose uptake in type 2 diabetes: a systematic review. *Diabetologia.* 2006;49(3):434-441.
50. Tan GD, Fielding BA, Currie JM, et al. The effects of rosiglitazone on fatty acid and triglyceride metabolism in type 2 diabetes. *Diabetologia.* 2005;48(1):83-95.
51. Jiang F, Zhang Z, Zhang Y, Wu J, Yu L, Liu S. L-carnitine ameliorates the liver inflammatory response by regulating carnitine palmitoyltransferase I-dependent PPARgamma signaling. *Mol Med Rep.* 2016;13(2):1320-1328.
52. Zhang Y, Cui Y, Wang XL, et al. PPARalpha/gamma agonists and antagonists differently affect hepatic lipid metabolism, oxidative stress and inflammatory cytokine production in steatohepatic rats. *Cytokine.* 2015;75(1):127-135.
53. Agarwal AK, Garg A. A novel heterozygous mutation in peroxisome proliferator-activated receptor-gamma gene in a patient with familial partial lipodystrophy. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002;87(1):408-411.
54. Savage DB, Tan GD, Acerini CL, et al. Human metabolic syndrome resulting from dominant-negative mutations in the nuclear receptor peroxisome proliferator-activated receptor-gamma. *Diabetes.* 2003;52(4):910-917.
55. Ehrhardt C, Schmolke M, Matzke A, et al. Polyethylenimine, a cost effective transfection reagent. *Signal Transduction.* 2006;6:179-184.
56. Chandra V, Huang P, Hamuro Y, et al. Structure of the intact PPAR-gamma-RXR- nuclear receptor complex on DNA. *Nature.* 2008;456(7220):350-356.
57. Eswar N, Webb B, Marti-Renom MA, et al. Comparative protein structure modeling using MODELLER. *Curr Protoc Protein Sci.* 2007;Chapter 2:Unit 2.9.
58. Jo S, Kim T, Iyer VG, Im W. CHARMM-GUI: a web-based graphical user interface for CHARMM. *J Comput Chem.* 2008;29(11):1859-1865.
59. Schneidman-Duhovny D, Inbar Y, Nussinov R, Wolfson HJ. PatchDock and SymmDock: servers for rigid and symmetric docking. *Nucleic Acids Res.* 2005;33(Web Server issue):W363-367.
60. Andrusier N, Nussinov R, Wolfson HJ. FireDock: fast interaction refinement in molecular docking. *Proteins.* 2007;69(1):139-159.

## Chapitre 3 : Conclusion et perspectives

Dans le but de mieux comprendre les mécanismes moléculaires qui sous-tendent les déséquilibres métaboliques tels l'obésité et le diabète de type 2 et suite aux précédents résultats de notre laboratoire ayant démontré la régulation négative de PPAR $\gamma$  par Shp1, nous avons cherché à caractériser le lien qui existe entre ces deux protéines. Nos recherches ont permis de mettre en évidence une nouvelle voie de régulation de la protéine PPAR $\gamma$  par la protéine tyrosine phosphatase Shp1. C'est la première fois qu'une interaction directe entre PPAR $\gamma$  et Shp1 est suggérée. Le LBD de PPAR $\gamma$  contient une séquence d'acides aminés commune aux substrats de Shp1 au cœur de laquelle se trouve la tyrosine 355. Nous avons proposé que l'interaction entre Shp1 et PPAR $\gamma$  dépende de la phosphorylation de la tyrosine 355, qui permettrait à la fois la liaison au domaine C-terminal et au domaine catalytique de Shp1 selon les prévisions obtenues par modélisation moléculaire. Cette double affinité de PPAR $\gamma$  pour deux domaines de Shp1 démontre que PPAR $\gamma$  pourrait être un substrat de Shp1. Nous avons d'ailleurs démontré que Shp1 a un rôle à jouer dans la régulation de la phosphorylation sur tyrosine de PPAR $\gamma$ . En effet, en absence de Shp1, la phosphorylation totale de la protéine est augmentée. L'augmentation de Shp1 dans les tissus métaboliques observée chez les souris obèses signifierait donc une déphosphorylation plus importante de PPAR $\gamma$  ce qui entraînerait une réduction de son activité et la diminution de ses effets anti-inflammatoires et insulino-sensibilisants <sup>161</sup>. Cette interaction Shp1-PPAR $\gamma$  pourrait ainsi participer aux déséquilibres métaboliques associés à l'obésité telle la résistance à l'insuline soit en favorisant leur mise en place, soit en les exacerbant.

Nos résultats ont également permis d'approfondir le rôle de la phosphorylation sur tyrosine de PPAR $\gamma$  qui demeure très peu étudiée jusqu'à maintenant. Nous avons d'abord confirmé que PPAR $\gamma$  peut être phosphorylé sur plusieurs de ses résidus tyrosine. La mutation de certains des résidus tyrosine pour en bloquer la phosphorylation a démontré que la phosphorylation sur tyrosine régule l'activité de PPAR $\gamma$  et que cet effet varie selon la localisation de la tyrosine mutée. En ce sens, les mutations des résidus tyrosine localisés dans le domaine AF-1 ont très peu d'impact sur l'activité de la protéine par rapport aux mutations des résidus situés dans le LBD. La tyrosine 355 s'est révélée être un acide aminé particulièrement intéressant. Localisée dans le LBD, en plus d'être possiblement impliquée dans l'interaction avec Shp1, la tyrosine 355 serait aussi essentielle à la liaison avec la rosiglitazone. Selon les prédictions obtenues par modélisation moléculaire, lorsqu'elle est phosphorylée, la tyrosine 355 permettrait de réduire la distance entre le LBD et la rosiglitazone. En absence de phosphorylation, la distance demeurerait trop grande pour qu'un lien hydrogène puisse être établi entre PPAR $\gamma$  et son agoniste. De plus, la phosphorylation de la tyrosine 355 module l'activité de PPAR $\gamma$  autant en l'absence qu'en présence de rosiglitazone: sa déphosphorylation diminue fortement l'activité de la protéine alors, qu'à l'inverse, sa phosphorylation tend à l'augmenter.

Sachant que la tyrosine 355 est à la fois le résidu clé de l'interaction avec Shp1 et avec la rosiglitazone, il est pertinent de se demander s'il existe une compétition entre ces deux molécules pour la liaison avec PPAR $\gamma$ . Ceci pourrait contribuer à l'effet agoniste de la rosiglitazone qui, en plus d'activer PPAR $\gamma$ , pourrait déplacer Shp1 et ainsi lever son action inhibitrice. En ce sens, nous avons vérifié si la présence de rosiglitazone affecte la liaison entre PPAR $\gamma$  et Shp1. Les expériences préliminaires effectuées jusqu'à maintenant n'ont pas permis de démontrer que la rosiglitazone diminuait significativement l'interaction entre Shp1 et PPAR $\gamma$  (Fig. 3.1). Toutefois, il est possible que les conditions utilisées n'aient pas permis de détecter de variation dans l'interaction entre les deux protéines qui est très rapide et transitoire. D'autres méthodes devront être utilisées pour vérifier cette hypothèse avant de pouvoir déterminer s'il existe une compétition entre Shp1 et la rosiglitazone pour la liaison avec PPAR $\gamma$ .



**Figure 3.1** Effet de la rosiglitazone sur l'interaction entre PPAR $\gamma$  et Shp1. **(A)** Les cellules HepG2 ont été transfectées avec les plasmides indiqués et traitées avec différentes concentrations de rosiglitazone durant 16 heures. Les lysats cellulaires ont été analysés par immunobuvardage après une immunoprécipitation utilisant des anticorps anti-Flag. Essai représentatif de trois essais. **(B)** Quantification de Shp1 avec Flag-PPAR $\gamma$ 2 immunoprécipité comme contrôle (n=3).

Les TZD sont des molécules très efficaces dans le contrôle de la glycémie des patients diabétiques. Toutefois, leurs nombreux effets secondaires ont grandement restreint leur utilisation. Par opposition aux TZD qui sont des agonistes complets de la protéine PPAR $\gamma$ , plusieurs s'intéressent désormais aux agonistes partiels de la protéine. Il a été démontré qu'une activation de faible ampleur de PPAR $\gamma$  permet d'activer seulement quelques-unes des voies contrôlées par la protéine <sup>163, 164</sup>. Plusieurs recherches sont présentement en cours pour tenter de développer des agonistes partiels de PPAR $\gamma$  permettant de sélectionner seulement les voies d'activation de la protéine associées aux effets désirés sans entraîner d'effets nocifs pour la santé. Certains de ces agonistes partiels de la molécule sont déjà en train d'être évalués en phase clinique <sup>165</sup>. Nos résultats soutiennent l'idée que la phosphorylation de la tyrosine 355 permet d'activer PPAR $\gamma$  en absence d'agoniste, mais à un niveau moindre que l'activation induite par la rosiglitazone. Cet effet est particulièrement intéressant puisqu'il rappelle celui des agonistes partiels.

Pour la suite du projet, il serait intéressant d'évaluer les effets physiologiques entraînés par la phosphorylation de la tyrosine 355 en déterminant quelles sont les voies métaboliques contrôlées. Ainsi, il serait d'abord nécessaire d'identifier la kinase responsable de cette phosphorylation et de déterminer quels sont les mécanismes qui la régulent. Une fois ces conditions déterminées, il faudra évaluer les effets de la phosphorylation de la tyrosine 355 en évaluant les modifications dans l'expression génique et les niveaux protéiques des cibles de PPAR $\gamma$ . Parmi les voies métaboliques à analyser, il faudra, entre autres, investiguer les voies régulatrices de l'inflammation, du transport du glucose, de la transduction du signal de l'insuline, du transport des lipides et de leur synthèse. À plus long terme, bien sûr, l'objectif de ces expérimentations est de pouvoir tester nos observations dans un milieu *in vivo*, d'abord chez l'animal et, si possible, si les résultats sont concluants, chez l'humain. Ces résultats pourraient mener au développement de molécules pouvant activer sélectivement certaines voies d'action de PPAR $\gamma$ . Étant donné les effets positifs de l'activation de PPAR $\gamma$  sur la sensibilité à l'insuline, sur la diminution de l'inflammation et sur la redistribution des graisses au niveau sous-cutané, les molécules développées pourraient être utilisées dans le traitement ou le contrôle de troubles métaboliques tels l'obésité, le diabète de type 2 ou la stéatose hépatique non alcoolique <sup>78, 98, 99, 100, 101, 105</sup>.

Notre démarche possède bien sûr quelques limitations qui devront être abordées dans de futures expérimentations. Les hépatocytes utilisés proviennent de cellules cancéreuses. Il faut considérer que le métabolisme énergétique de ces cellules peut démontrer des divergences avec celui des cellules non cancéreuses. Il faut toutefois mentionner que les résultats ont été comparés dans différents types cellulaires qui ne proviennent pas uniquement de cellules cancéreuses dont, entre autres, des hépatocytes primaires de souris. De plus, les hépatocytes, des cellules HepG2, utilisés pour la majorité des expériences sont d'origine

humaine ce qui est en lien avec l'objectif de l'élaboration d'un futur traitement applicable chez l'humain. Les protéines étudiées sont le produit de la transfection de plasmides dans les cellules. Les niveaux de transfection peuvent varier d'une cellule à l'autre. Ainsi, l'effet de nos traitements a pu être diminué puisque nous analysons le mélange formé par ces cellules ayant des niveaux de transfection différents. Le tri des cellules transfectées et non transfectées pourrait être utile dans de futures expérimentations. Aussi, la majorité des résultats sont le produit de la surexpression des protéines dans les cellules. La confirmation de nos observations dans un modèle plus physiologique devra également être faite pour s'assurer que nos résultats ne sont pas uniquement le fruit d'interactions forcées par la trop grande abondance des protéines étudiées. Les résultats de la modélisation moléculaire n'étant que des probabilités, il faudra démontrer par des expériences de co-immunoprécipitation, effectuées avec des segments tronqués de la protéine Shp1, quels sont les domaines et les sites précis avec lesquels PPAR $\gamma$  interagit. Il serait aussi intéressant de trouver les kinases ainsi que les conditions physiologiques favorisant la phosphorylation sur tyrosine de PPAR $\gamma$  plutôt que d'utiliser le bpV(HOpic) qui est un inhibiteur général des protéines tyrosines phosphatases. Il existe des outils permettant de prédire les kinases les plus susceptibles de se lier à une séquence d'acides aminés spécifique. Les informations que nous ont fourni ces outils jusqu'à maintenant sont toutefois peu précises et très variables. Nous avons donc prévu d'utiliser des inhibiteurs spécifiques de kinases pour évaluer leur impact sur la phosphorylation sur tyrosine de PPAR $\gamma$ . Parmi les kinases ciblées, il faudra entre autres s'attarder à celles de la famille SRC dont l'interaction avec l'une d'elles, c-Src, et PPAR $\gamma$  a déjà été démontrée<sup>134</sup>. De plus, pour identifier les stimuli capables d'engendrer une augmentation de la phosphorylation sur tyrosine de PPAR $\gamma$ , nous avons déjà effectué quelques investigations préliminaires et testé certaines molécules dont le FGF21, l'insuline, le phorbol-myristate-acétate (PMA), l'IL-1 $\beta$ , le TNF- $\alpha$  et l'interféron gamma (INF $\gamma$ ). Aucune de ces molécules n'a révélé avoir d'effet sur les niveaux de phosphorylation sur tyrosine de la protéine. Bien sûr, d'autres molécules devront être testées, dont les acides gras, qui sont des agonistes endogènes de la protéine<sup>117</sup>. Le but de ces expérimentations *in vitro* est également de pouvoir confirmer nos observations dans un environnement plus physiologique en effectuant des investigations *in vivo*.

L'obésité et le diabète touchent de plus en plus d'individus partout sur la planète. L'amélioration des habitudes de vie demeure, et doit demeurer, la base du traitement de ces désordres métaboliques. Toutefois, c'est une modalité de traitement très difficile à mettre en place chez la majorité des patients. Il faut souvent coupler des médicaments aux changements des habitudes de vie pour pouvoir améliorer le profil métabolique des individus de façon significative. Bien que plusieurs médicaments soient présentement sur le marché pour le traitement du diabète, chacun d'entre eux a ses désavantages qui limitent leur utilisation que ce soit leur coût ou les effets secondaires qu'ils entraînent. Pour ce qui est de l'obésité, très peu de médicaments sont présentement approuvés pour être utilisés dans le traitement de ce déséquilibre métabolique. Ceux qui sont

disponibles entraînent d'importants effets secondaires. Le diabète de type 2 et l'obésité étant souvent des conditions chroniques, les patients seront sous pharmacothérapie durant plusieurs années de leur vie et même durant leur vie entière. Il est donc nécessaire que les médicaments utilisés soient le plus efficaces possible, qu'ils soient sécuritaires et qu'ils n'engendrent que peu ou pas d'effets secondaires. Pour toutes ces raisons, il est important de développer de nouvelles thérapies ciblant ces troubles métaboliques dans le but d'améliorer la qualité de vie des patients et des futurs patients.

# Bibliographie

1. Hossain P, Kavar B, El Nahas M. Obesity and diabetes in the developing world--a growing challenge. *N Engl J Med.* 2007;356(3):213-215.
2. Forouzanfar MH, Alexander L, Anderson HR, et al. Global, regional, and national comparative risk assessment of 79 behavioural, environmental and occupational, and metabolic risks or clusters of risks in 188 countries, 1990-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet.* 2015;386(10010):2287-2323.
3. Bellisari A. Evolutionary origins of obesity. *Obes Rev.* 2008;9(2):165-180.
4. Agarwal RA, Srivastava AK, Kumar K. *Animal Physiology and Biochemistry.* Fifth revised edition ed. New Delhi 2013.
5. Mergenthaler P, Lindauer U, Dienel GA, Meisel A. Sugar for the brain: the role of glucose in physiological and pathological brain function. *Trends Neurosci.* 2013;36(10):587-597.
6. Boucher J, Kleinridders A, Kahn CR. Insulin receptor signaling in normal and insulin-resistant states. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2014;6(1).
7. Avruch J. Insulin signal transduction through protein kinase cascades. *Mol Cell Biochem.* 1998;182(1-2):31-48.
8. Sun XJ, Crimmins DL, Myers MG, Jr., Miralpeix M, White MF. Pleiotropic insulin signals are engaged by multisite phosphorylation of IRS-1. *Mol Cell Biol.* 1993;13(12):7418-7428.
9. Czech MP. PIP2 and PIP3: complex roles at the cell surface. *Cell.* 2000;100(6):603-606.
10. Franke TF, Yang SI, Chan TO, et al. The protein kinase encoded by the Akt proto-oncogene is a target of the PDGF-activated phosphatidylinositol 3-kinase. *Cell.* 1995;81(5):727-736.
11. Cherrington AD, Moore MC, Sindelar DK, Edgerton DS. Insulin action on the liver in vivo. *Biochem Soc Trans.* 2007;35(Pt 5):1171-1174.
12. OMS. 10 faits sur l'obésité. 2014; <http://www.who.int/features/factfiles/obesity/fr/>. Accessed 23 février 2016, 2016.
13. Global Health Observatory data. [http://www.who.int/gho/ncd/risk\\_factors/overweight/en/](http://www.who.int/gho/ncd/risk_factors/overweight/en/). Accessed 27 nov, 2015.
14. Despres JP. Body fat distribution and risk of cardiovascular disease: an update. *Circulation.* 2012;126(10):1301-1313.
15. Coalition québécoise sur la problématique du poids. 2015; <http://www.cqpp.qc.ca/fr/epidemie-d-obesite/statistiques>. Accessed 20 nov, 2015.
16. Vague J. [Not Available]. *Presse Med.* 1947;55(30):339.
17. Pouliot MC, Despres JP, Lemieux S, et al. Waist circumference and abdominal sagittal diameter: best simple anthropometric indexes of abdominal visceral adipose tissue accumulation and related cardiovascular risk in men and women. *Am J Cardiol.* 1994;73(7):460-468.
18. Despres JP, Lemieux I. Abdominal obesity and metabolic syndrome. *Nature.* 2006;444(7121):881-887.
19. Kim SH, Despres JP, Koh KK. Obesity and cardiovascular disease: friend or foe? *Eur Heart J.* 2015.
20. Miranda PJ, DeFronzo RA, Califf RM, Guyton JR. Metabolic syndrome: definition, pathophysiology, and mechanisms. *Am Heart J.* Vol 149. United States 2005:33-45.
21. Kelley DE, Mandarino LJ. Fuel selection in human skeletal muscle in insulin resistance: a reexamination. *Diabetes.* 2000;49(5):677-683.
22. Mittelman SD, Van Citters GW, Kirkman EL, Bergman RN. Extreme insulin resistance of the central adipose depot in vivo. *Diabetes.* 2002;51(3):755-761.
23. Despres JP, Moorjani S, Lupien PJ, Tremblay A, Nadeau A, Bouchard C. Regional distribution of body fat, plasma lipoproteins, and cardiovascular disease. *Arteriosclerosis.* 1990;10(4):497-511.
24. Pereira SS, Alvarez-Leite JL. Low-Grade Inflammation, Obesity, and Diabetes. *Curr Obes Rep.* 2014;3(4):422-431.

25. Cote M, Mauriege P, Bergeron J, et al. Adiponectinemia in visceral obesity: impact on glucose tolerance and plasma lipoprotein and lipid levels in men. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005;90(3):1434-1439.
26. Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante AW, Jr. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest.* 2003;112(12):1796-1808.
27. Abbasi F, Brown BW, Jr., Lamendola C, McLaughlin T, Reaven GM. Relationship between obesity, insulin resistance, and coronary heart disease risk. *J Am Coll Cardiol.* 2002;40(5):937-943.
28. Kusminski CM, Shetty S, Orci L, Unger RH, Scherer PE. Diabetes and apoptosis: lipotoxicity. *Apoptosis.* 2009;14(12):1484-1495.
29. Yu C, Chen Y, Cline GW, et al. Mechanism by which fatty acids inhibit insulin activation of insulin receptor substrate-1 (IRS-1)-associated phosphatidylinositol 3-kinase activity in muscle. *J Biol Chem.* 2002;277(52):50230-50236.
30. Chavez JA, Knotts TA, Wang LP, et al. A role for ceramide, but not diacylglycerol, in the antagonism of insulin signal transduction by saturated fatty acids. *J Biol Chem.* 2003;278(12):10297-10303.
31. Blouin CM, Prado C, Takane KK, et al. Plasma membrane subdomain compartmentalization contributes to distinct mechanisms of ceramide action on insulin signaling. *Diabetes.* 2010;59(3):600-610.
32. Zhang J, Gao Z, Yin J, Quon MJ, Ye J. S6K directly phosphorylates IRS-1 on Ser-270 to promote insulin resistance in response to TNF-(alpha) signaling through IKK2. *J Biol Chem.* 2008;283(51):35375-35382.
33. Rotter V, Nagaev I, Smith U. Interleukin-6 (IL-6) induces insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes and is, like IL-8 and tumor necrosis factor-alpha, overexpressed in human fat cells from insulin-resistant subjects. *J Biol Chem.* 2003;278(46):45777-45784.
34. Elchebly M, Payette P, Michaliszyn E, et al. Increased insulin sensitivity and obesity resistance in mice lacking the protein tyrosine phosphatase-1B gene. *Science.* 1999;283(5407):1544-1548.
35. Ouwens DM, van der Zon GC, Maassen JA. Modulation of insulin-stimulated glycogen synthesis by Src Homology Phosphatase 2. *Mol Cell Endocrinol.* 2001;175(1-2):131-140.
36. Riboulet-Chavey A, Pierron A, Durand I, Murdaca J, Giudicelli J, Van Obberghen E. Methylglyoxal impairs the insulin signaling pathways independently of the formation of intracellular reactive oxygen species. *Diabetes.* 2006;55(5):1289-1299.
37. Furukawa S, Fujita T, Shimabukuro M, et al. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *J Clin Invest.* 2004;114(12):1752-1761.
38. Fernandez-Sanchez A, Madrigal-Santillan E, Bautista M, et al. Inflammation, oxidative stress, and obesity. *Int J Mol Sci.* 2011;12(5):3117-3132.
39. He J, Watkins S, Kelley DE. Skeletal muscle lipid content and oxidative enzyme activity in relation to muscle fiber type in type 2 diabetes and obesity. *Diabetes.* 2001;50(4):817-823.
40. Kelley DE, He J, Menshikova EV, Ritov VB. Dysfunction of mitochondria in human skeletal muscle in type 2 diabetes. *Diabetes.* 2002;51(10):2944-2950.
41. Ozata M, Mergen M, Oktenli C, et al. Increased oxidative stress and hypozincemia in male obesity. *Clin Biochem.* 2002;35(8):627-631.
42. Dokken BB, Saengsirisuwan V, Kim JS, Teachey MK, Henriksen EJ. Oxidative stress-induced insulin resistance in rat skeletal muscle: role of glycogen synthase kinase-3. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2008;294(3):E615-621.
43. Perreault M, Marette A. Targeted disruption of inducible nitric oxide synthase protects against obesity-linked insulin resistance in muscle. *Nat Med.* 2001;7(10):1138-1143.
44. White PJ, Charbonneau A, Cooney GJ, Marette A. Nitrosative modifications of protein and lipid signaling molecules by reactive nitrogen species. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2010;299(6):E868-878.
45. Charbonneau A, Marette A. Inducible nitric oxide synthase induction underlies lipid-induced hepatic insulin resistance in mice: potential role of tyrosine nitration of insulin signaling proteins. *Diabetes.* 2010;59(4):861-871.

46. Centeno-Baez C, Dallaire P, Marette A. Resveratrol inhibition of inducible nitric oxide synthase in skeletal muscle involves AMPK but not SIRT1. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2011;301(5):E922-930.
47. Boden G, Shulman GI. Free fatty acids in obesity and type 2 diabetes: defining their role in the development of insulin resistance and beta-cell dysfunction. *Eur J Clin Invest.* 2002;32 Suppl 3:14-23.
48. Eckel RH, Grundy SM, Zimmet PZ. The metabolic syndrome. *Lancet.* 2005;365(9468):1415-1428.
49. Leahy JL, Cooper HE, Deal DA, Weir GC. Chronic hyperglycemia is associated with impaired glucose influence on insulin secretion. A study in normal rats using chronic in vivo glucose infusions. *J Clin Invest.* 1986;77(3):908-915.
50. Vetere A, Choudhary A, Burns SM, Wagner BK. Targeting the pancreatic beta-cell to treat diabetes. *Nat Rev Drug Discov.* 2014;13(4):278-289.
51. Unger RH, Zhou YT. Lipotoxicity of beta-cells in obesity and in other causes of fatty acid spillover. *Diabetes.* 2001;50 Suppl 1:S118-121.
52. Buteau J. SBM-2014 Santé cardiorespiratoire et obésité Résistance à l'insuline et diabète. Université Laval 2012.
53. Vazquez G, Duval S, Jacobs DR, Jr., Silventoinen K. Comparison of body mass index, waist circumference, and waist/hip ratio in predicting incident diabetes: a meta-analysis. *Epidemiol Rev.* 2007;29:115-128.
54. *Global report on diabetes.* Geneva 2016.
55. WHO. WHO Mortality Database. 2016; [http://www.who.int/healthinfo/mortality\\_data/en/](http://www.who.int/healthinfo/mortality_data/en/). Accessed 20 juillet, 2016.
56. Bourne RR, Stevens GA, White RA, et al. Causes of vision loss worldwide, 1990-2010: a systematic analysis. *Lancet Glob Health.* 2013;1(6):e339-349.
57. Sarwar N, Gao P, Seshasai SR, et al. Diabetes mellitus, fasting blood glucose concentration, and risk of vascular disease: a collaborative meta-analysis of 102 prospective studies. *Lancet.* 2010;375(9733):2215-2222.
58. *2014 USRDS annual data report: Epidemiology of kidney disease in the United States.* Bethesda 2014.
59. Moxey PW, Gogalniceanu P, Hinchliffe RJ, et al. Lower extremity amputations--a review of global variability in incidence. *Diabet Med.* 2011;28(10):1144-1153.
60. Katsiki N, Mikhailidis DP, Mantzoros CS. Non-alcoholic fatty liver disease and dyslipidemia: An update. *Metabolism.* 2016;65(8):1109-1123.
61. The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. The Diabetes Control and Complications Trial Research Group. *N Engl J Med.* 1993;329(14):977-986.
62. Cusi K. Role of obesity and lipotoxicity in the development of nonalcoholic steatohepatitis: pathophysiology and clinical implications. *Gastroenterology.* 2012;142(4):711-725.e716.
63. Angulo P, Lindor KD. Non-alcoholic fatty liver disease. *J Gastroenterol Hepatol.* 2002;17 Suppl:S186-190.
64. Dixon JB, Bhathal PS, O'Brien PE. Nonalcoholic fatty liver disease: predictors of nonalcoholic steatohepatitis and liver fibrosis in the severely obese. *Gastroenterology.* 2001;121(1):91-100.
65. Röss C, Kaser S. Mechanisms of intrahepatic triglyceride accumulation. *World J Gastroenterol.* 2016;22(4):1664-1673.
66. Koliaki C, Szendroedi J, Kaul K, et al. Adaptation of hepatic mitochondrial function in humans with non-alcoholic fatty liver is lost in steatohepatitis. *Cell Metab.* 2015;21(5):739-746.
67. Pessayre D, Fromenty B, Mansouri A. Mitochondrial injury in steatohepatitis. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2004;16(11):1095-1105.
68. Baffy G. MicroRNAs in Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *J Clin Med.* 2015;4(12):1977-1988.
69. Hubscher SG. Histological assessment of non-alcoholic fatty liver disease. *Histopathology.* 2006;49(5):450-465.

70. Matteoni CA, Younossi ZM, Gramlich T, Boparai N, Liu YC, McCullough AJ. Nonalcoholic fatty liver disease: a spectrum of clinical and pathological severity. *Gastroenterology*. 1999;116(6):1413-1419.
71. Tahrani AA, Barnett AH, Bailey CJ. Pharmacology and therapeutic implications of current drugs for type 2 diabetes mellitus. *Nat Rev Endocrinol*. 2016.
72. Risk of hypoglycaemia in types 1 and 2 diabetes: effects of treatment modalities and their duration. *Diabetologia*. 2007;50(6):1140-1147.
73. Guardado-Mendoza R, Prioletta A, Jimenez-Ceja LM, Sosale A, Folli F. The role of nateglinide and repaglinide, derivatives of meglitinide, in the treatment of type 2 diabetes mellitus. *Arch Med Sci*. 2013;9(5):936-943.
74. Bailey CJ. The Current Drug Treatment Landscape for Diabetes and Perspectives for the Future. *Clin Pharmacol Ther*. 2015;98(2):170-184.
75. Goldenberg R, Clement M, Hanna A, et al. *Traitement pharmacologique du diabète de type 2: mise à jour intérimaire 2016*. Association canadienne du diabète pour la prévention et le traitement du diabète au Canada;2016.
76. Krentz AJ, Bailey CJ. Oral antidiabetic agents: current role in type 2 diabetes mellitus. *Drugs*. 2005;65(3):385-411.
77. Hauner H. The mode of action of thiazolidinediones. *Diabetes Metab Res Rev*. 2002;18 Suppl 2:S10-15.
78. Blanchard PG, Turcotte V, Cote M, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma activation favours selective subcutaneous lipid deposition by coordinately regulating lipoprotein lipase modulators, fatty acid transporters and lipogenic enzymes. *Acta Physiol (Oxf)*. 2016;217(3):227-239.
79. Issemann I, Green S. Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators. *Nature*. 1990;347(6294):645-650.
80. Dreyer C, Krey G, Keller H, Givel F, Helftenbein G, Wahli W. Control of the peroxisomal beta-oxidation pathway by a novel family of nuclear hormone receptors. *Cell*. 1992;68(5):879-887.
81. Kliewer SA, Forman BM, Blumberg B, et al. Differential expression and activation of a family of murine peroxisome proliferator-activated receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994;91(15):7355-7359.
82. Evans RM, Barish GD, Wang YX. PPARs and the complex journey to obesity. *Nat Med*. 2004;10(4):355-361.
83. Reddy JK, Hashimoto T. Peroxisomal beta-oxidation and peroxisome proliferator-activated receptor alpha: an adaptive metabolic system. *Annu Rev Nutr*. 2001;21:193-230.
84. Desvergne B, Wahli W. Peroxisome proliferator-activated receptors: nuclear control of metabolism. *Endocr Rev*. 1999;20(5):649-688.
85. Rodriguez JC, Gil-Gomez G, Hegardt FG, Haro D. Peroxisome proliferator-activated receptor mediates induction of the mitochondrial 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase gene by fatty acids. *J Biol Chem*. 1994;269(29):18767-18772.
86. Wang YX, Lee CH, Tjep S, et al. Peroxisome-proliferator-activated receptor delta activates fat metabolism to prevent obesity. *Cell*. 2003;113(2):159-170.
87. Elbrecht A, Chen Y, Cullinan CA, et al. Molecular cloning, expression and characterization of human peroxisome proliferator activated receptors gamma 1 and gamma 2. *Biochem Biophys Res Commun*. 1996;224(2):431-437.
88. Moran-Salvador E, Titos E, Rius B, et al. Cell-specific PPARgamma deficiency establishes anti-inflammatory and anti-fibrogenic properties for this nuclear receptor in non-parenchymal liver cells. *J Hepatol*. 2013;59(5):1045-1053.
89. Choi SS, Park J, Choi JH. Revisiting PPARgamma as a target for the treatment of metabolic disorders. *BMB Rep*. 2014;47(11):599-608.
90. Kliewer SA, Umesono K, Noonan DJ, Heyman RA, Evans RM. Convergence of 9-cis retinoic acid and peroxisome proliferator signalling pathways through heterodimer formation of their receptors. *Nature*. 1992;358(6389):771-774.

91. Nolte RT, Wisely GB, Westin S, et al. Ligand binding and co-activator assembly of the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma. *Nature*. 1998;395(6698):137-143.
92. Iwata Y, Miyamoto S, Takamura M, Yanagisawa H, Kasuya A. Interaction between peroxisome proliferator-activated receptor gamma and its agonists: docking study of oximes having 5-benzyl-2,4-thiazolidinedione. *J Mol Graph Model*. 2001;19(6):536-542, 598-600.
93. Tsakovska I, Al Sharif M, Alov P, et al. Molecular modelling study of the PPARgamma receptor in relation to the mode of action/adverse outcome pathway framework for liver steatosis. *Int J Mol Sci*. 2014;15(5):7651-7666.
94. Lewis SN, Garcia Z, Hontecillas R, Bassaganya-Riera J, Bevan DR. Pharmacophore modeling improves virtual screening for novel peroxisome proliferator-activated receptor-gamma ligands. *J Comput Aided Mol Des*. 2015;29(5):421-439.
95. Tontonoz P, Hu E, Spiegelman BM. Stimulation of adipogenesis in fibroblasts by PPAR gamma 2, a lipid-activated transcription factor. *Cell*. 1994;79(7):1147-1156.
96. Motojima K, Passilly P, Peters JM, Gonzalez FJ, Latruffe N. Expression of putative fatty acid transporter genes are regulated by peroxisome proliferator-activated receptor alpha and gamma activators in a tissue- and inducer-specific manner. *J Biol Chem*. 1998;273(27):16710-16714.
97. Boden G, Homko C, Mozzoli M, Showe LC, Nichols C, Cheung P. Thiazolidinediones upregulate fatty acid uptake and oxidation in adipose tissue of diabetic patients. *Diabetes*. 2005;54(3):880-885.
98. Peraldi P, Xu M, Spiegelman BM. Thiazolidinediones block tumor necrosis factor-alpha-induced inhibition of insulin signaling. *J Clin Invest*. 1997;100(7):1863-1869.
99. Maeda N, Takahashi M, Funahashi T, et al. PPARgamma ligands increase expression and plasma concentrations of adiponectin, an adipose-derived protein. *Diabetes*. 2001;50(9):2094-2099.
100. Standaert ML, Kanoh Y, Sajjan MP, Bandyopadhyay G, Farese RV. Cbl, IRS-1, and IRS-2 mediate effects of rosiglitazone on PI3K, PKC-lambda, and glucose transport in 3T3/L1 adipocytes. *Endocrinology*. 2002;143(5):1705-1716.
101. Hernandez R, Teruel T, Lorenzo M. Rosiglitazone produces insulin sensitisation by increasing expression of the insulin receptor and its tyrosine kinase activity in brown adipocytes. *Diabetologia*. 2003;46(12):1618-1628.
102. Al-Khalili L, Forsgren M, Kannisto K, Zierath JR, Lonnqvist F, Krook A. Enhanced insulin-stimulated glycogen synthesis in response to insulin, metformin or rosiglitazone is associated with increased mRNA expression of GLUT4 and peroxisomal proliferator activator receptor gamma co-activator 1. *Diabetologia*. 2005;48(6):1173-1179.
103. Escher P, Braissant O, Basu-Modak S, Michalik L, Wahli W, Desvergne B. Rat PPARs: quantitative analysis in adult rat tissues and regulation in fasting and refeeding. *Endocrinology*. 2001;142(10):4195-4202.
104. Carpentier A, Taghibiglou C, Leung N, et al. Ameliorated hepatic insulin resistance is associated with normalization of microsomal triglyceride transfer protein expression and reduction in very low density lipoprotein assembly and secretion in the fructose-fed hamster. *J Biol Chem*. 2002;277(32):28795-28802.
105. Izzo P, Hallsten K, Oikonen V, et al. Effects of metformin and rosiglitazone monotherapy on insulin-mediated hepatic glucose uptake and their relation to visceral fat in type 2 diabetes. *Diabetes Care*. 2003;26(7):2069-2074.
106. Kim HI, Ahn YH. Role of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma in the glucose-sensing apparatus of liver and beta-cells. *Diabetes*. 2004;53 Suppl 1:S60-65.
107. Natali A, Ferrannini E. Effects of metformin and thiazolidinediones on suppression of hepatic glucose production and stimulation of glucose uptake in type 2 diabetes: a systematic review. *Diabetologia*. 2006;49(3):434-441.
108. Tan GD, Fielding BA, Currie JM, et al. The effects of rosiglitazone on fatty acid and triglyceride metabolism in type 2 diabetes. *Diabetologia*. 2005;48(1):83-95.

109. He W, Barak Y, Hevener A, et al. Adipose-specific peroxisome proliferator-activated receptor gamma knockout causes insulin resistance in fat and liver but not in muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(26):15712-15717.
110. Hevener AL, He W, Barak Y, et al. Muscle-specific Pparg deletion causes insulin resistance. *Nat Med*. 2003;9(12):1491-1497.
111. Gavrilova O, Haluzik M, Matsusue K, et al. Liver peroxisome proliferator-activated receptor gamma contributes to hepatic steatosis, triglyceride clearance, and regulation of body fat mass. *J Biol Chem*. 2003;278(36):34268-34276.
112. Agarwal AK, Garg A. A novel heterozygous mutation in peroxisome proliferator-activated receptor-gamma gene in a patient with familial partial lipodystrophy. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002;87(1):408-411.
113. Hegele RA, Cao H, Frankowski C, Mathews ST, Leff T. PPARG F388L, a transactivation-deficient mutant, in familial partial lipodystrophy. *Diabetes*. 2002;51(12):3586-3590.
114. Savage DB, Tan GD, Acerini CL, et al. Human metabolic syndrome resulting from dominant-negative mutations in the nuclear receptor peroxisome proliferator-activated receptor-gamma. *Diabetes*. 2003;52(4):910-917.
115. Stanley TB, Leesnitzer LM, Montana VG, et al. Subtype specific effects of peroxisome proliferator-activated receptor ligands on corepressor affinity. *Biochemistry*. 2003;42(31):9278-9287.
116. Phillips KJ, Rosenbaum DM, Liu DR. Binding and stability determinants of the PPARgamma nuclear receptor-coactivator interface as revealed by shotgun alanine scanning and in vivo selection. *J Am Chem Soc*. 2006;128(34):11298-11306.
117. Krey G, Braissant O, L'Horsset F, et al. Fatty acids, eicosanoids, and hypolipidemic agents identified as ligands of peroxisome proliferator-activated receptors by coactivator-dependent receptor ligand assay. *Mol Endocrinol*. 1997;11(6):779-791.
118. Dallaire P, Bellmann K, Laplante M, et al. Obese mice lacking inducible nitric oxide synthase are sensitized to the metabolic actions of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonism. *Diabetes*. 2008;57(8):1999-2011.
119. Dutchak PA, Katafuchi T, Bookout AL, et al. Fibroblast growth factor-21 regulates PPARgamma activity and the antidiabetic actions of thiazolidinediones. *Cell*. 2012;148(3):556-567.
120. Liu C, Feng T, Zhu N, et al. Identification of a novel selective agonist of PPARgamma with no promotion of adipogenesis and less inhibition of osteoblastogenesis. *Sci Rep*. 2015;5:9530.
121. Yamashita D, Yamaguchi T, Shimizu M, Nakata N, Hirose F, Osumi T. The transactivating function of peroxisome proliferator-activated receptor gamma is negatively regulated by SUMO conjugation in the amino-terminal domain. *Genes Cells*. 2004;9(11):1017-1029.
122. Yang XJ, Gregoire S. A recurrent phospho-sumoyl switch in transcriptional repression and beyond. *Mol Cell*. 2006;23(6):779-786.
123. Pascual G, Fong AL, Ogawa S, et al. A SUMOylation-dependent pathway mediates transrepression of inflammatory response genes by PPAR-gamma. *Nature*. 2005;437(7059):759-763.
124. Waite KJ, Floyd ZE, Arbour-Reily P, Stephens JM. Interferon-gamma-induced regulation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma and STATs in adipocytes. *J Biol Chem*. 2001;276(10):7062-7068.
125. Hauser S, Adelmant G, Sarraf P, Wright HM, Mueller E, Spiegelman BM. Degradation of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma is linked to ligand-dependent activation. *J Biol Chem*. 2000;275(24):18527-18533.
126. Floyd ZE, Stephens JM. Interferon-gamma-mediated activation and ubiquitin-proteasome-dependent degradation of PPARgamma in adipocytes. *J Biol Chem*. 2002;277(6):4062-4068.
127. Katsura S, Okumura T, Ito R, Sugawara A, Yokoyama A. Identification of Posttranslational Modifications in Peroxisome Proliferator-Activated Receptor gamma Using Mass Spectrometry. *PPAR Res*. 2014;2014:468925.
128. Hu E, Kim JB, Sarraf P, Spiegelman BM. Inhibition of adipogenesis through MAP kinase-mediated phosphorylation of PPARgamma. *Science*. 1996;274(5295):2100-2103.

129. Compe E, Drane P, Laurent C, et al. Dysregulation of the peroxisome proliferator-activated receptor target genes by XPD mutations. *Mol Cell Biol.* 2005;25(14):6065-6076.
130. Iankova I, Petersen RK, Annicotte JS, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma recruits the positive transcription elongation factor b complex to activate transcription and promote adipogenesis. *Mol Endocrinol.* 2006;20(7):1494-1505.
131. Banks AS, McAllister FE, Camporez JP, et al. An ERK/Cdk5 axis controls the diabetogenic actions of PPARgamma. *Nature.* 2015;517(7534):391-395.
132. Keshet R, Bryansker Kraitshtein Z, Shanzer M, Adler J, Reuven N, Shaul Y. c-Abl tyrosine kinase promotes adipocyte differentiation by targeting PPAR-gamma 2. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014;111(46):16365-16370.
133. Xu Y, Jin J, Zhang W, et al. EGFR/MDM2 signaling promotes NF-kappaB activation via PPARgamma degradation. *Carcinogenesis.* 2016;37(2):215-222.
134. Choi S, Jung JE, Yang YR, et al. Novel phosphorylation of PPARgamma ameliorates obesity-induced adipose tissue inflammation and improves insulin sensitivity. *Cell Signal.* 2015;27(12):2488-2495.
135. Xu E, Forest MP, Schwab M, et al. Hepatocyte-specific Ptpn6 deletion promotes hepatic lipid accretion, but reduces NAFLD in diet-induced obesity: potential role of PPARgamma. *Hepatology.* 2014;59(5):1803-1815.
136. Shen SH, Bastien L, Posner BI, Chretien P. A protein-tyrosine phosphatase with sequence similarity to the SH2 domain of the protein-tyrosine kinases. *Nature.* 1991;352(6337):736-739.
137. Matthews RJ, Bowne DB, Flores E, Thomas ML. Characterization of hematopoietic intracellular protein tyrosine phosphatases: description of a phosphatase containing an SH2 domain and another enriched in proline-, glutamic acid-, serine-, and threonine-rich sequences. *Mol Cell Biol.* 1992;12(5):2396-2405.
138. Yoshida K, Kharbanda S, Kufe D. Functional interaction between SHPTP1 and the Lyn tyrosine kinase in the apoptotic response to DNA damage. *J Biol Chem.* 1999;274(49):34663-34668.
139. Jones ML, Craik JD, Gibbins JM, Poole AW. Regulation of SHP-1 tyrosine phosphatase in human platelets by serine phosphorylation at its C terminus. *J Biol Chem.* 2004;279(39):40475-40483.
140. Dubois MJ, Bergeron S, Kim HJ, et al. The SHP-1 protein tyrosine phosphatase negatively modulates glucose homeostasis. *Nat Med.* Vol 12. United States 2006:549-556.
141. Ram PA, Waxman DJ. Interaction of growth hormone-activated STATs with SH2-containing phosphotyrosine phosphatase SHP-1 and nuclear JAK2 tyrosine kinase. *J Biol Chem.* 1997;272(28):17694-17702.
142. Craggs G, Kellie S. A functional nuclear localization sequence in the C-terminal domain of SHP-1. *J Biol Chem.* 2001;276(26):23719-23725.
143. Simoneau M, Boulanger J, Coulombe G, Renaud MA, Duchesne C, Rivard N. Activation of Cdk2 stimulates proteasome-dependent truncation of tyrosine phosphatase SHP-1 in human proliferating intestinal epithelial cells. *J Biol Chem.* 2008;283(37):25544-25556.
144. Sephton CF, Zhang D, Lehmann TM, Pennington PR, Scheid MP, Mousseau DD. The nuclear localization of 3'-phosphoinositide-dependent kinase-1 is dependent on its association with the protein tyrosine phosphatase SHP-1. *Cell Signal.* 2009;21(11):1634-1644.
145. Denu JM, Tanner KG. Specific and reversible inactivation of protein tyrosine phosphatases by hydrogen peroxide: evidence for a sulfenic acid intermediate and implications for redox regulation. *Biochemistry.* 1998;37(16):5633-5642.
146. Ke K, Sul OJ, Choi EK, Safdar AM, Kim ES, Choi HS. Reactive oxygen species induce the association of SHP-1 with c-Src and the oxidation of both to enhance osteoclast survival. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2014;307(1):E61-70.
147. Yang J, Liu L, He D, et al. Crystal structure of human protein-tyrosine phosphatase SHP-1. *J Biol Chem.* 2003;278(8):6516-6520.
148. Xu E, Schwab M, Marette A. Role of protein tyrosine phosphatases in the modulation of insulin signaling and their implication in the pathogenesis of obesity-linked insulin resistance. *Rev Endocr Metab Disord.* 2014;15(1):79-97.

149. Yi TL, Cleveland JL, Ihle JN. Protein tyrosine phosphatase containing SH2 domains: characterization, preferential expression in hematopoietic cells, and localization to human chromosome 12p12-p13. *Mol Cell Biol.* 1992;12(2):836-846.
150. Banville D, Stocco R, Shen SH. Human protein tyrosine phosphatase 1C (PTPN6) gene structure: alternate promoter usage and exon skipping generate multiple transcripts. *Genomics.* 1995;27(1):165-173.
151. Yi T, Ihle JN. Association of hematopoietic cell phosphatase with c-Kit after stimulation with c-Kit ligand. *Mol Cell Biol.* 1993;13(6):3350-3358.
152. Yi T, Mui AL, Krystal G, Ihle JN. Hematopoietic cell phosphatase associates with the interleukin-3 (IL-3) receptor beta chain and down-regulates IL-3-induced tyrosine phosphorylation and mitogenesis. *Mol Cell Biol.* 1993;13(12):7577-7586.
153. Klingmuller U, Lorenz U, Cantley LC, Neel BG, Lodish HF. Specific recruitment of SH-PTP1 to the erythropoietin receptor causes inactivation of JAK2 and termination of proliferative signals. *Cell.* 1995;80(5):729-738.
154. Marengere LE, Waterhouse P, Duncan GS, Mittrucker HW, Feng GS, Mak TW. Regulation of T cell receptor signaling by tyrosine phosphatase SYP association with CTLA-4. *Science.* 1996;272(5265):1170-1173.
155. Zhang Q, Raghunath PN, Vonderheid E, Odum N, Wasik MA. Lack of phosphotyrosine phosphatase SHP-1 expression in malignant T-cell lymphoma cells results from methylation of the SHP-1 promoter. *Am J Pathol.* 2000;157(4):1137-1146.
156. Sheng Y, Wang H, Liu D, et al. Methylation of tumor suppressor gene CDH13 and SHP1 promoters and their epigenetic regulation by the UHRF1/PRMT5 complex in endometrial carcinoma. *Gynecol Oncol.* 2016;140(1):145-151.
157. Cuevas BD, Lu Y, Mao M, et al. Tyrosine phosphorylation of p85 relieves its inhibitory activity on phosphatidylinositol 3-kinase. *J Biol Chem.* 2001;276(29):27455-27461.
158. Lodeiro M, Alen BO, Mosteiro CS, et al. The SHP-1 protein tyrosine phosphatase negatively modulates Akt signaling in the ghrelin/GHSR1a system. *Mol Biol Cell.* 2011;22(21):4182-4191.
159. Poy MN, Yang Y, Rezaei K, et al. CEACAM1 regulates insulin clearance in liver. *Nat Genet.* 2002;30(3):270-276.
160. Bergeron S, Dubois MJ, Bellmann K, et al. Inhibition of the protein tyrosine phosphatase SHP-1 increases glucose uptake in skeletal muscle cells by augmenting insulin receptor signaling and GLUT4 expression. *Endocrinology.* 2011;152(12):4581-4588.
161. Xu E, Charbonneau A, Rolland Y, et al. Hepatocyte-specific Ptpn6 deletion protects from obesity-linked hepatic insulin resistance. *Diabetes.* Vol 61. United States 2012:1949-1958.
162. Asante-Appiah E, Kennedy BP. Protein tyrosine phosphatases: the quest for negative regulators of insulin action. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2003;284(4):E663-670.
163. Miles PD, Barak Y, He W, Evans RM, Olefsky JM. Improved insulin-sensitivity in mice heterozygous for PPAR-gamma deficiency. *J Clin Invest.* 2000;105(3):287-292.
164. Rocchi S, Picard F, Vamecq J, et al. A unique PPARgamma ligand with potent insulin-sensitizing yet weak adipogenic activity. *Mol Cell.* 2001;8(4):737-747.
165. Taygerly JP, McGee LR, Rubenstein SM, et al. Discovery of INT131: a selective PPARgamma modulator that enhances insulin sensitivity. *Bioorg Med Chem.* 2013;21(4):979-992.